

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS
BROUSSAIS — HOTEL - DIEU

Année 1971

N°

51

THESE

Pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

par

PIERRE CORVOL

INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS

DIPLOMÉ D'ÉTUDES APPROFONDIES DE BIOCHIMIE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 1971

ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET PHYSIO-PATHOLOGIQUE DE LA
TESTOSTERONE-ESTRADIOL BINDING GLOBULIN (TEBG) CHEZ L'HOMME

Président : Monsieur P. MILLIEZ, Professeur.

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS
BROUSSAIS — HOTEL - DIEU

Année 1971

N°

THESE

Pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

par

PIERRE CORVOL

INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS
DIPLOMÉ D'ÉTUDES APPROFONDIES DE BIOCHIMIE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET PHYSIO-PATHOLOGIQUE DE LA
TESTOSTERONE-ESTRADIOL BINDING GLOBULIN (TEBG) CHEZ L'HOMME

Président : Monsieur P. MILLIEZ, Professeur.

THESE

DOCTORAL BY MEDICINE



A MES PARENTS

A MA FEMME

A MA FILLE





A mon maître,

Le Professeur PAUL MILLIEZ,

avec le témoignage de ma respectueuse
admiration et l'expression de ma
gratitude pour la richesse humaine
de l'enseignement qu'il m'a prodigué.

Aux Docteurs

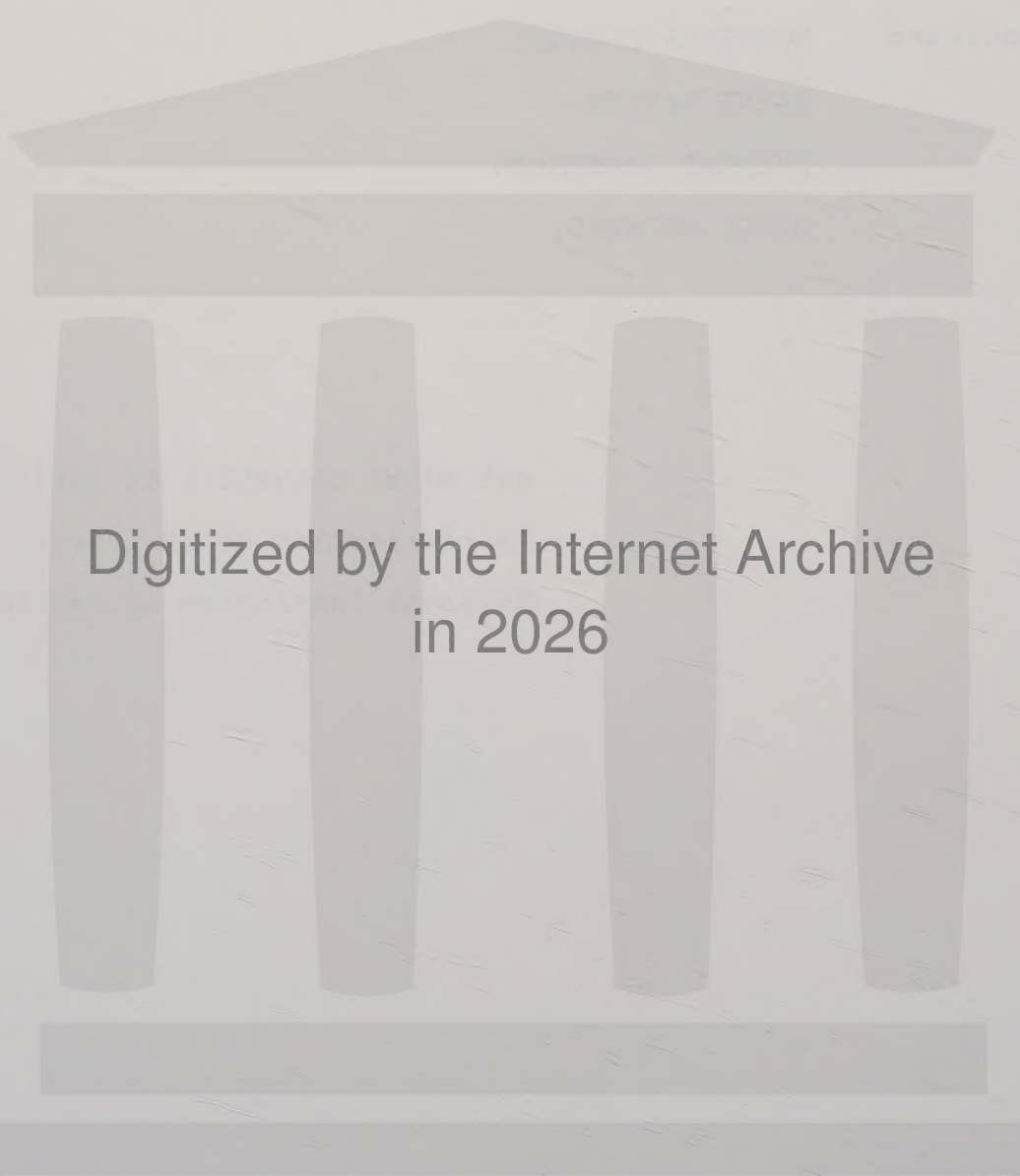
MORTIMER LIPSETT

WAYNE BARDIN

ANDREAS CHRAMBACH

DAVID RODBARD,

qui m'ont accueilli et guidé dans
la réalisation de ce travail au
National Institutes of Health.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556020_0015

MAITRES D'INTERNAT :

Le Professeur LEMAIRE

Le Professeur PERRAULT

Le Professeur TURBAT

Le Professeur MILLIEZ

Le Professeur MILLIEZ

Le Professeur BRICAIRE

A MES MAITRES D'EXTERNAT :

Le Professeur LEGER

Le Professeur MORIN

Le Professeur LHERMITTE

Le Professeur BRICAIRE

A tous ceux qui ont contribué à me faire aimer
cette profession :

Le Professeur DEBRAY

Le Professeur agrégé DRY

Le Professeur agrégé BATTESTI

Le Professeur LEGRAND

Le Professeur agrégé MAUVAIS-JARVIS

Le Docteur DRAY

Le Docteur GUILLEMANT

Le Professeur agrégé LUTON

POSITION DU PROBLEME

Nous avons étudié dans cette thèse une protéine plasmatique qui joue un rôle primordial dans le transport des androgènes et des oestrogènes : la Testosterone-estradiol Binding Globulin (TeBG). Cette protéine est aussi appelée sex binding protein (SBP) par Baulieu et Coll (24).

L'importance de la liaison de ces stéroïdes sexuels à cette protéine plasmatique réside dans l'hypothèse que seul le stéroïde libre, c'est-à-dire non lié aux protéines, pourrait franchir la barrière capillaire et pénétrer dans l'espace interstitiel puis dans les cellules cibles des organes effecteurs ou hypothalamo-hypophysaires. Les protéines de transport par leur concentration et leur affinité vis à vis des stéroïdes sexuels régiraient donc la concentration du stéroïde libre, actif, et pourraient avoir un rôle de distribution locale du stéroïde aux divers organes cibles ou métaboliques.

La testostérone est liée dans le plasma à 3 protéines : l'albumine, la cortisol binding globulin (CBG) et la TeBG, mais seule la dernière a un rôle capital. En effet, bien qu'étant en très faible concentration dans le plasma, la très haute affinité de la TeBG vis à vis de la testostérone et de l'oestradiol en fait le vecteur principal des androgènes et des oestrogènes.

Pour étudier les caractéristiques physicochimiques

et la physio-pathologie de cette protéine, il était nécessaire d'avoir recours à une méthode qui permette de séparer le stéroïde lié spécifiquement à la TeBG du stéroïde lié à la CBG et à l'albumine et du stéroïde libre. Aussi avons nous utilisé essentiellement pour ce travail le gel de polyacrylamide qui permettait de résoudre au mieux ce problème technique.

Dans une première partie nous décrirons les caractéristiques physico-chimiques (poids moléculaire, valence, p^H isoélectrique, capacité de liaison) de la TeBG après avoir rappelé les conditions d'utilisation du gel de polyacrylamide.

Puis nous étudierons les principales données physiopathologiques de cette protéine et les notions que l'on peut en tirer pour mieux relier le transport des stéroïdes sexuels à leur métabolisme et à leur mode d'action.

HISTORIQUE DE LA TeBG

La TeBG a été découverte récemment par Mercier et Coll (21), en 1965. Toutefois il était connu que la testostérone était liée dans le plasma à l'albumine et à la CBG. La liaison testostérone-albumine humaine caractérisée par une faible constante d'affinité (K_a) = $4,19 \times 10^4$ l/mole à 25°C (48) est aspécifique dans le sens où tout stéroïde est lié par l'albumine. Cette liaison n'est toutefois pas à négliger vu le taux élevé de l'albumine dans le plasma. La liaison CBG-testostérone est plus forte : $K_a = 5 \times 10^6$ l/mole à 25°C (49). Toutefois ceci ne représente que 15% de l'affinité du cortisol pour la CBG. Cette protéine étant en outre à faible concentration (2,5 mg /100 ml de plasma), la liaison CBG-testostérone n'a probablement que peu d'importance physiologique.

La TeBG a été pressentie en 1959 par Slaunwhite (in 48) puis en 1961 par Chen et Coll (in 48) qui ont constaté que le plasma avait une plus haute affinité pour la testostérone qu'une solution d'albumine humaine à la même concentration. L'existence d'une β globuline, en faible concentration, liant très fortement la testostérone a été démontrée par Mercier et Coll (21). Ceci fut confirmé par d'autres auteurs qui montrèrent aussi qu'elle était différente de la CBG (15,44). Peu après Rosenbaum et Coll (38) démontraient, par électrophorèse sur papier, l'existence d'une fraction protéique plasmatique, migrant avec les β globulines, différente de l'albumine et qui liait fortement l'oestradiol. Il fut montré ensuite que ce stéroïde était déplacé de se(s) site(s) de liaison par la testostérone et

d'autres androgènes (18,19,23). Ces données suggéraient fortement qu'une seule protéine plasmatique liait à la fois les androgènes et les oestrogènes.

1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide

1- Rappel théorique sur la détermination du rayon moléculaire, du poids moléculaire et de la charge des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide réalise un fractionnement de molécules fondé à la fois sur leur charge nette et leur taille. Ceci s'oppose aux méthodes de fractionnement plus habituellement utilisées et qui utilisent soit la charge des molécules (chromatographie par échange d'ion, isoélectrofocusing...), soit leur configuration (filtration sur gel, sédimentation...).

Il existe une relation linéaire entre le logarithme de la mobilité électrophorétique et la concentration du gel dans l'électrophorèse sur gel (37) :

$$\text{Log } (M) = \text{Log } (M_0) - K_R T \quad (1)$$

Equation de Ferguson (12).

où M = mobilité électrophorétique

K_R = coefficient de retard de migration

T = concentration totale du gel (monomère + agent de liaison).

Cette relation a été démontrée par Ferguson pour les gels d'amidon (12) puis pour les gels de polyacrylamide (36,37).

Il a été montré par Rodbard et Chrambach que la migration d'une particule à travers un gel composé d'une trame de fibres orientées statistiquement répondait à l'équation générale d'Ogston (37). Ce modèle prévoit une relation entre la géométrie de la molécule et le coefficient de retard de migration (K_R) de la

molécule à travers le gel :

$$\sqrt{K_R} = C (\bar{R} + r) \quad (2)$$

où $\bar{R}$ = rayon moléculaire

r = rayon effectif de la fibre du gel

C = constante

Les équations (1) et (2) ont été vérifiées expérimentalement dans un grand nombre d'expériences (cf bibliographie dans 6,36), ainsi que dans ce travail.

L'équation (1) de Ferguson peut être extrapolée à une concentration nulle de gel ($T = 0$), ce qui conduit à une estimation de la mobilité électrophorétique libre (M_0) : la validité de cette équation a pu être testée par comparaison directe des résultats d'électrophorèse en zone libre (36). Lorsque la mobilité électrophorétique (M_0), le rayon moléculaire, $\bar{R}$, la force ionique et le rayon de l'ion opposé sont connus, il est possible de calculer la charge nette de la molécule et sa valence par les équations de Booth-Henry-Gorin (in 6,36).

Un programme sur calculatrice a été utilisé pour calculer l'erreur (méthode des moindres carrés) sur les équations (1) et (2). Les limites de confiance du rayon moléculaire et de la charge nette de la molécule ont pu être ainsi calculées. Dans cette étude on a donc utilisé les données d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide mises au point par Rodbard et Chrambach en utilisant les avantages des systèmes de tampon multiphasique, les relations de Ferguson (1), les relations entre le rayon moléculaire et K_R (2) et l'équation de Henry.

B - Méthodes

1- Polymérisation

- des conditions strictement standardisées ont été utilisées

pour pratiquer la polymérisation des gels : de telles conditions sont indispensables pour obtenir 97 à 98% de polymérisation et donc pour avoir une excellente reproductibilité des mesures de mobilité relative (Rf).

- L'acrylamide et le Bis-Acrylamide ont été recristallisés à partir de l'acétone. La tétraméthyléthylènediamine (Teemed) a été redistillée sous vide. L'hydroxyéthyl morpholine a été redistillée et l'acide cacodylique recristallisé.

- La réaction de photopolymérisation a été contrôlée en déaérant la mixture du gel sous vide réduit (10 mm Hg) afin de diminuer la quantité d'O₂, inhibiteur de la réaction. La photopolymérisation initiée par le persulfate et accélérée par le Teemed se fait à 4°C pendant 30 mn.

- Les 3 systèmes de tampon multiphasique utilisés sont décrits dans le tableau I. Tous trois ont un pH opératif alcalin (pH après migration dans le gel de séparation) : le système B est opératif à 10,2 , le système C à 8,9 et D à 7,8.

- Les gels de concentration furent faits à T^{*} = 3,125% et C^{**} = 20% ou T = 3%, C = 2%. Les gels de séparation variaient de T = 4 à 18% tandis que C restait constant, égal à 2%.

2- Electrophorèse

- Les électrophorèses ont été pratiquées sous courant constant : 2 mA par tube dans le système B et 1 mA par tube dans les systèmes C et D.

* T% = concentration totale du gel (g/100 ml)

T = Acrylamide + Bis-Acrylamide

** C% = pourcentage d'agent de liaison = $\frac{\text{Bis-Acrylamide}}{T}$

Tableau I. - Composition finale des 3 tampons multiphasiques

Phase		Systèmes de tampon à 0°C		
		B	C	D
	PI de génération	10.2	9.88	7.8
	Force ionique de génération	0,0168	0,0184	0,0100
S	Composé (M)	glycine	tricine	TES (2)
		0,0461	0,0117	0,0223
	Composé (M)	Tris	HEM (1)	Bis-tris (3)
		0,0126	0,006	0,0190
GS	Composé (M)	H ₃ PO ₄	Acide cacodylique	acide cacodyli-
		0,0320	0,0150	0,0150
	Composé (M)	Tris	HEM	Bis-tris
		0,0416	0,0147	0,0215
GI	Composé (M)	HCl	HCl	HCl
		0,0600	0,0285	0,0391
	Composé (M)	Tris	HEM	Bis-tris
		0,3750	0,4330	0,1070
I	Composé (M)	HCl	HCl	HCl
		0,060	0,0500	0,060
	Composé (M)	Tris	HEM	Bis-tris
		0,0625	0,0625	0,0625

(M) = molarité de chaque constituant

S = tampon supérieur ; TGS = tampon du gel supérieur

I = tampon inférieur ; TGI = tampon du gel inférieur

1) N- β -hydroxyethylmorpholine

2) N-tris(hydroxyméthyl) méthyl-2-amino-méthane acide sulfonique

3) BIS (2-hydroxyéthyl) - tris (hydroxyméthyl) méthane.

8
- Le contrôle à 4°C de la température durant l'électrophorèse est assuré par une circulation continue d'eau à 4°C dans l'appareil d'électrophorèse.

- La mesure de la mobilité électrophorétique des protéines à la fin de l'électrophorèse est pratiquée :

* soit par coloration des protéines par le bleu de Coomassie (5) ou par le noir d'Amidon.

* soit par section longitudinale des gels et autoradiographie des bandes ainsi produites.

* soit par section transversale des gels en tranches de 1,3 mm et comptage en scintillation liquide.

Dans nos conditions expérimentales le bleu de bromophénol avait une mobilité relative de 1,0 , si bien que les R_f 's des protéines standards et des protéines de liaison des stéroïdes pouvaient être calculés par référence directe à ce colorant.

3 - détermination du rayon moléculaire et de la charge nette de la TeBG.

- calcul de K_R et de Y_0 : pour chaque protéine standard ou inconnue, la droite de régression du logarithme de R_f en fonction de la concentration du gel, T , était déterminée par calculateur. Celui-ci calculait en outre les 95% de confiance autour de la ligne et les limites de 95% de confiance pour une seule observation autour de la ligne en utilisant les valeurs t de Student. La droite est donc déterminée par 1) K_R , sa pente et 2) la valeur de R_f quand $T = 0$, soit Y_0 .

- calcul du rayon moléculaire et du poids moléculaire

Les protéines standards utilisées dans cette étude sont indiquées dans le tableau II avec leur poids moléculaire et leur rayon ($\bar{R}$). Le rayon géométrique utilisé ici est défini par Rodbard et Chrambach

TABLE II

Standard Proteins

Protein	Protein Source	Mol. Weight (a)	Mol. Radius (b)	Electrophoretic System
Soybean Trypsin Inhib.	Worthington.	22700.	1.88.	D
Pepsinogen.	Worthington.	40400.	2.28.	C
Ovalbumin.	Mann.	43500.	2.34.	B, C, D
Fetuin.	Calbiochem.	48400.	2.42.	C
Bovine Serum Albumin-Monomer.	Mann.	67000.	2.69.	B, C, D
Pepsin-Dimer.	Mann.	71000.	2.75.	B, C
Transferrin.	Pentex.	74000.	2.79.	B, C, D
BSA-dimer.	Mann.	134000.	3.4.	B, C, D
Phycocerythrin.	Dr. H. W. Siegelman.	290000.	4.39.	B, C, D
Fibrinogen.	Dr. J. Finlayson.	340000.	4.64.	B
Ferritin.	Pentex.	450000.	5.09.	B, C, D
Thyroglobulin.	Dr. H. Edelhoch.	670000.	5.81.	B

(a) References of the molecular weights listed in this table are from D. Rodbard and C. Chrambach (6).

(b) Geometric mean radius, $\bar{R}$ (M) is calculated from the known molecular weight using the relationship $\bar{R} = \sqrt[3]{\frac{3MW}{4\pi N}}$, where N = Avogadro's number, MW = Molecular weight. This assumes that the molecules are unhydrated spheres of partial specific volume, $\bar{v}$, 0.74 (6).

$$\bar{R} = \sqrt[3]{\frac{3(M\omega)\bar{v}}{4\pi N}} \quad (3)$$

où $\bar{v}$ = volume partiel spécifique. Le $\bar{v}$ des protéines a été pris à 0,74, celui de la TeBG à 0,66, valeur récemment déterminée par Mercier-Bodard et Coll (24). N = nombre d'Avogadro, $M\omega$ = poids moléculaire. Ce rayon suppose des molécules non hydratées et doit donc être considéré comme transitoire dans la mesure où des protéines standards peuvent s'écarter par leur $\bar{v}$ et leur hydratation des conditions théoriques de l'équation (3).

Un autre programme permettait le calcul de la droite de régression de $\bar{R}$ en fonction de $\sqrt{K_R}$ (équation 2). Le programme calcule les rayons avec leurs limites de confiance à 95% pour la TeBG. Les valeurs furent converties en estimation de poids moléculaire en utilisant l'équation (3). Les protéines standards utilisées sont indiquées dans le tableau II.

- calcul de la mobilité électrophorétique libre

La mobilité électrophorétique libre est :

$$M_o = Y_o \text{ uf} \quad (4)$$

où uf = mobilité du front et $Y_o = R_f$ quand $T = 0$ et est calculée à partir du premier programme.

$$\text{uf} = RM(1,9) \times u_{Na^+}$$

où u_{Na^+} = mobilité de l'ion sodium

$RM(1,9)$ = mobilité du front vis à vis du sodium dans la phase opérative de séparation(6,36).

Ces données sont exploitées dans un autre programme qui permet outre la mesure de la mobilité électrophorétique de déterminer la valence de la molécule. Plusieurs assumptions pour la validité de ce calcul ont été exposées par Rodbard et Chrambach (36,37).

- calcul de la concentration optimale de gel pour obtenir le maximum de séparation et de résolution entre la TeBG et la transferrine.

Durant cette étude, il apparut qu'un problème majeur survenait pour séparer la TeBG de la transferrine dans les systèmes utilisés. Des gels de 5 à 10% T ne permettaient pas de séparer correctement la TeBG de la transferrine et on a étudié les conditions optimales de séparation : le maximum de séparation entre 2 espèces "A" et "B" apparaît quand (37) :

$$T \text{ max} = \frac{\text{Ln} (A \alpha / B \beta)}{\alpha - \beta} \quad (5)$$

où "A" = Y_0 pour A, B = Y_0 pour "B", $\alpha = K_R (\text{Ln} (10))$ pour "A" et $\beta = K_R (\text{Ln} (10))$ pour "B".

Quand $\alpha \cong \beta$, la séparation maximale apparaît quand T = 0 et (ou) lorsque la mobilité moyenne des 2 espèces est égale à $\mu / e = 0,368$, où μ = mobilité du point à l'intersection des courbes de Ferguson pour les 2 protéines.

La résolution optimale n'apparaît pas quand la séparation est maximale puisque la largeur de bande de protéine dépend aussi de la concentration du gel.

La résolution peut être définie par :

$$Z = \frac{M_A - M_B}{\sqrt{\sigma_A^2 + \sigma_B^2}} \quad (6)$$

où M_A , M_B sont les mobilités des 2 bandes et σ_A^2 , σ_B^2 sont les variances des bandes (noter l'analogie avec le test t de Student). En assumant que la largeur de la bande est déterminée seulement par la diffusion :

$$\sigma^2 = 2 D t \quad (7)$$

où D = constante de diffusion

t = temps

Le coefficient de diffusion pour chaque espèce dans un gel en fonction de la concentration du gel est une relation exponentielle négative (in 37), du moins en première approximation.

$$D = D_0 e^{-bT} \quad (8)$$

où D_0 = coefficient de diffusion libre, b une constante. Pour une molécule sphérique obéissant à la loi de Stoke :

$$D_0 = \frac{K T}{6\eta \bar{R}} \propto \frac{1}{\bar{R}} \quad (9)$$

où K = constante de Boltzmann, T = température absolue, η = viscosité du milieu. Nous assumerons que b dans l'équation (8) est donné par:

$$b = K_R (\ln (10)) \quad (10)$$

en combinant les équations 6, 7, 8, 9 et en assumant un temps constant et un gradient de voltage,

$$Z = c \frac{A e^{-\alpha T} - B e^{-\beta T}}{\sqrt{\frac{e^{-\alpha T}}{\bar{R}_A} + \frac{e^{-\beta T}}{\bar{R}_B}}} \quad (11)$$

où c = constante = $\sqrt{\frac{t}{2 K T} \frac{6\eta}{K T}}$, où t = temps

Lorsque $R_A \cong R_B$, $A \cong B$ et la résolution optimale apparaîtra quand la mobilité est μ/b^2 et (ou) quand $T = 0$, où μ = mobilité au point d'intersection (37) comme ci-dessus.

Quand d'autres facteurs (c'est-à-dire l'erreur de mesure, la variation dans l'épaisseur des tranches de gel, les effets électrostatiques, etc...) contribuent à la largeur de la bande en plus de la diffusion, on devrait les inclure dans l'équation (7) (in 37).

$$b^2 = 2 D t + K_1 t + K \quad (12)$$

II- Isoélectrofocusing de la TeBG sur gel d'acrylamide

L'isoelectrofocusing de la TeBG a été pratiquée sur gel de polyacrylamide suivant la technique récemment mise au point par P. Doerr et A. Chrambach (n° 6).

Un gel de 3,5% T, C = 4% fut choisi car il n'entraînait pas d'effet de tamisage moléculaire. 4% d'ampholine (LKB) de pH 3-10 fut ajouté à la solution habituelle de polymérisation.

Le réservoir supérieur contenait 0,4% d'une solution aqueuse d'éthylènediamine et le réservoir inférieur 0,02% d'acide sulfurique.

Le plasma incubé avec la testostérone-³H a été soumis à l'isoelectrofocusing durant 9 h et dans une autre expérience pendant 13 h, sous un voltage constant de 200 volts. On a ainsi vérifié par ces 2 temps différents que la TeBG atteignait bien son point isoélectrique.

A la fin de l'isoelectrofocusing, le gel est coupé transversalement (45 tranches environ) et sur chaque tranche, éluee par 0,1 M NaCl, on lit successivement le pH et la radioactivité.

III- Préparation des stéroïdes et autres réactifs

Les stéroïdes radioactifs obtenus chez New England Corp. (NEN) furent purifiés par chromatographie sur couche mince avant leur usage : testostérone-1, 2-³H, 56 Ci/m Mole ; testostérone-4-¹⁴C, 50 m Ci/m Mole ; estradiol-6,7-³H, 50 Ci/m Mole ; corticostérone-1, 2-³H, 57 Ci/m Mole ; progestérone-1, 2³H, 50 Ci/m Mole ; 5 α dihydrotestostérone (5 α DHT)-1, 2-³H, 50 Ci/m Mole.

Les stéroïdes non radioactifs obtenus auprès de Mann Biochemicals furent recristallisés 2 fois dans des solvants organiques et leur pureté vérifiée occasionnellement par point de fusion et chromatographie en phase gazeuse.

15

Le chlorure de fer $^{59}\text{Fe}_2\text{Cl}_3$ provenait de NEN (40 g par g de fer). La transferrine- ^{59}Fe fut préparée en incubant à 37°C pendant 15 mn 100 μl de plasma avec 0,1 μC de $^{59}\text{Fe}_2\text{Cl}_3$.

IV- Préparation des plasmas.

Nous avons obtenu du sang héparisé à 8h00 provenant de femmes et d'hommes normaux. D'autres plasmas provenaient de femmes enceintes au cours du 3ème trimestre d'une grossesse normale et de femmes traitées par 5 mg de diéthylstilboestrol pendant 15 jours. Du plasma contenant un taux très faible de cortisol endogène fut obtenu en prélevant le plasma de femmes enceintes traitées par 8 mg de dexaméthasone pendant 3 jours.

Ce plasma était conservé en aliquots de 0,5 ml à -40°C pour n'avoir à ne décongeler qu'une fois un échantillon. Toutefois nous n'avons pas observé de modifications de valeurs de la capacité de liaison de la TeBG lorsqu'on décongèle-recongèle puis redécongèle un plasma.

Incubation des plasmas : des solutions aqueuses de stéroïdes furent faites extemporanément : les solutions contenaient : 83,17 et 10×10^{-9} M et 6×10^6 cpm de tritium par ml. Deux solutions pour double marquage ont aussi été préparées : l'une contenait 5×10^{-8} M de testostérone- ^{14}C et d'oestradiol- ^3H ; le rapport de dpm H^3/C^{14} était de 10. L'autre solution contenait de la testostérone- ^3H et de la transferrine marquée au ^{59}Fe , le rapport de dpm $^3\text{H}/^{59}\text{Fe}$ étant de 2. Pour marquer les protéines vectrices des stéroïdes, 10 μl d'une solution appropriée était incubée avec 100 μl de plasma pendant 30 mn à la température de la pièce, en agitant doucement. Ces échantillons étaient ensuite refroidis à 0°C et on ajoutait 390 μl de tampon de gel supérieur et 500 μl

de sucrose à 50%. 50 μ l de chaque échantillon (correspondant donc à 5 μ l de plasma, soit à 350 μ g de protéines totales environ) était alors soumis immédiatement à l'électrophorèse.

V- Mesure de la Radioactivité

Le tritium, le ^{14}C et le ^{59}Fe furent mesurés dans un Packard tri carb , modèle 4322. Les fenêtres et les gains avaient été réglés pour obtenir un quenching négligeable et un rendement de 51% et de 32% respectivement pour le C^{14} et le tritium. La contamination en C^{14} du canal tritium était de 25% tandis que la contamination en tritium dans le canal C^{14} était moins de 0,1%. Le ^{59}Fe fut compté dans le canal C^{14} avec une contamination de 24% dans le canal tritium. Pour déterminer une méthode efficace pour compter les stéroïdes liés aux protéines dans les tranches de gel de polyacrylamide, les gels ont été marqués de manière uniforme en incorporant du plasma contenant de la DHT- ^3H dans la solution de polymérisation. Puis, après polymérisation les gels sont coupés et les tranches déposées dans une fiole de comptage, contenant 5 ml d'une solution standard de comptage (toluène 960 ml, liquifluor (NEN), 40 ml). Dans ces conditions on extrait $83 \pm 3\%$ du stéroïde à partir des tranches de 1,3mm de ces gels ainsi marqués uniformément.

Dans une expérience, la testostérone- ^{14}C a été mesurée quantitativement par autoradiographie de gels sectionnés longitudinalement (6,36) et comportant environ 1000 cpm/gel; le temps d'exposition a été de 3 mois.

I- Mise en évidence des protéines plasmatiques de liaison des stéroïdes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Le plasma d'une femme traitée aux oestrogènes et ayant reçu de la dexaméthasone pour supprimer sa production de cortisol est incubé avec des stéroïdes tritiés ($0,25 \times 10^{-8} M$), comme il a été décrit dans la section "matériels et méthodes". Ce plasma après avoir été dilué au 1/10, est soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans le système B (pH = 10,2), T = 8%, C = 2%, à 2 mA par tube, l'anode étant à droite (figure 1) . Le front, indiqué par le bleu de bromophénol ., est marqué d'une flèche. Un gel de référence a été coloré par le bleu de Coomassie et la position de l'albumine ($R_f = 0,62$) est indiquée par la zone hachurée. Il faut noter que des expériences contrôles ont permis de vérifier que les stéroïdes libres, non liés, molécules non chargées, ne pénétraient pas dans le gel. Ceci est aussi vrai pour l'oestradiol qui n'est pas chargé au pH opératif 10,2 et qui ne pénètre donc pas non plus dans le gel.

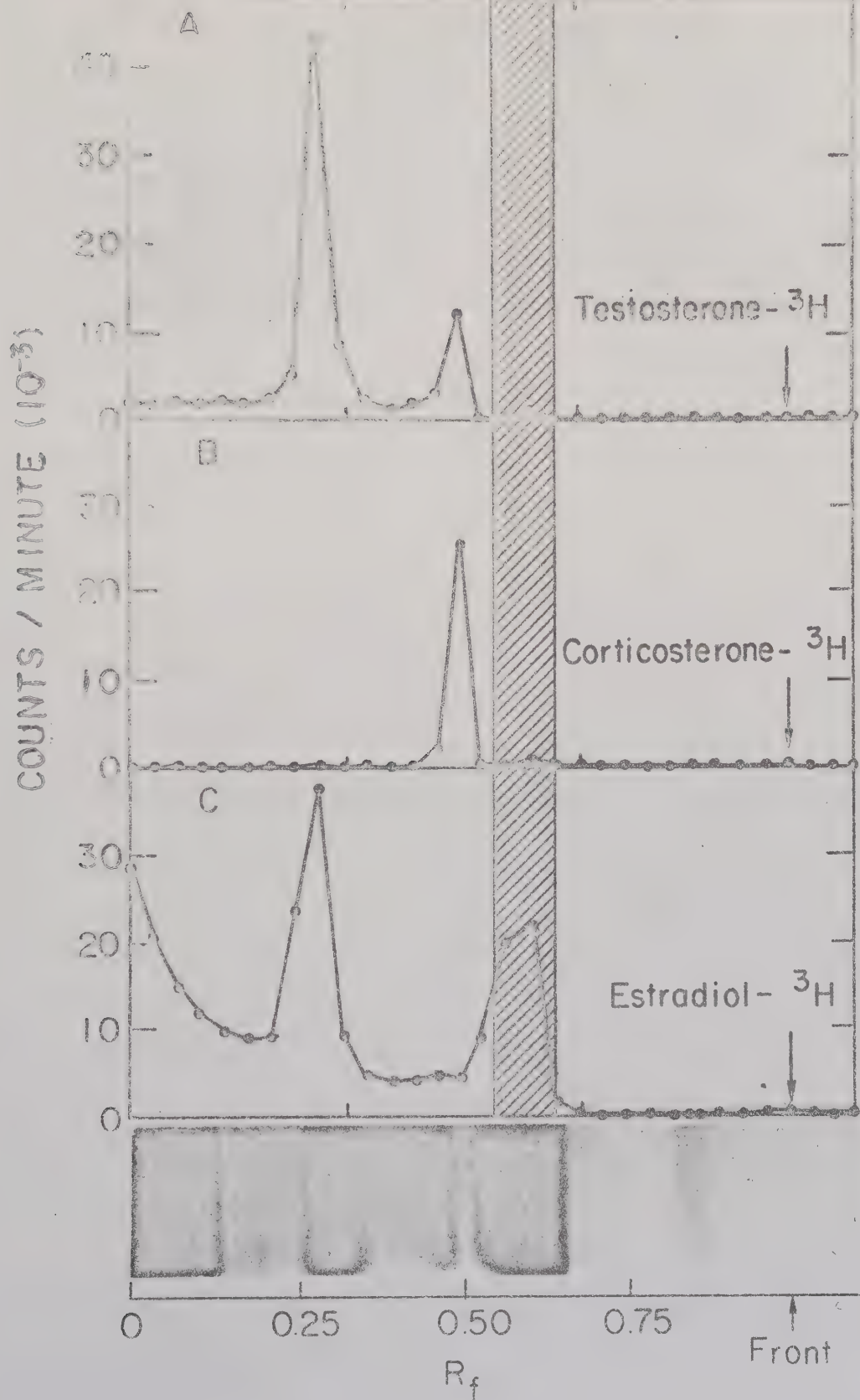
1) La figure (1, a) montre que la testostérone tritiée est liée à deux bandes protéiques. La bande de migration la plus lente ($R_f = 0,33$) qui migre avec la transferrine a été identifiée comme étant la TeBG par sa capacité à lier la testostérone, la 5 α DHT et l'oestradiol, mais non les stéroïdes C_{21} tritiés : cortisol, corticostérone, progestérone, 17 α hydroxyprogestérone, aldostérone, désoxycorticostérone. La bande protéique de migration plus rapide liant la testostérone est la CBG.

2) La corticostérone- 3H (fig 1, b) se lie en effet à la CBG qui a la même R_f (0,52) que la protéine rapide liant la testo-

SLICE NUMBER

10

20



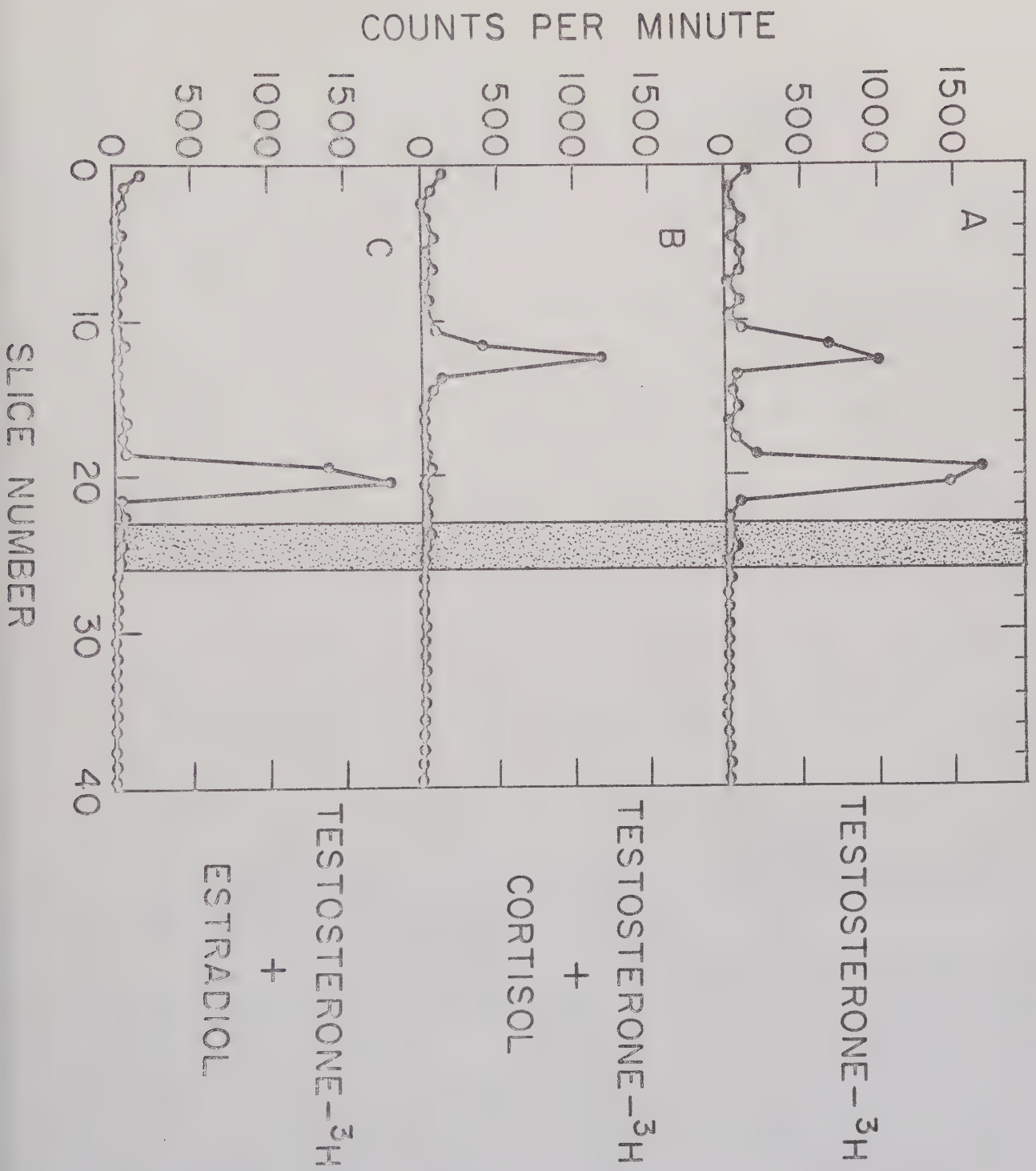
stérone. En outre, nous avons vérifié que dans ce système les stéroïdes C_{21} précités se lient aussi à la CBG. A noter, que pour mettre en évidence la liaison de l'aldostérone- H^3 à la CBG, il faut recourir à un artifice : on incorpore dans les gels de concentration et de séparation 20,000 cpm d'aldostérone- 3H . La CBG lors de sa migration est alors continuellement en contact avec l'aldostérone- 3H et la liaison CBG-aldostérone est ainsi visible malgré sa faible constante d'affinité ($K_a = 7 \times 10^6$ l/M à 10°C.).

3) L'oestradiol- 3H (fig 1, c) est lié aussi à deux protéines : l'une de migration lente, ayant le même Rf (0,31) que celle liant la testostérone, est la TeBG ; l'autre de migration rapide a le Rf de l'albumine (0,62).

Il faut noter que dans ce système et les autres utilisés, la K_a de l'albumine vis à vis des stéroïdes autres que l'oestradiol est trop faible pour mettre en évidence une autre liaison stéroïde-albumine. Lors de la migration électrophorétique (2 heures), le stéroïde se dissocie continuellement de l'albumine, de même qu'il existe une dissociation du stéroïde de l'albumine lors d'une colonne de Séphadex. Ce background élevé observé dans la figure 1, c est le reflet de cette dissociation continue du stéroïde de l'albumine. Notons qu'une albumine humaine purifiée (GIBCO) a été utilisée comme standard pour l'identification de l'albumine plasmatique. Ses propriétés de liaison vis à vis de différents ligands étaient les mêmes que celles de l'albumine plasmatique.

II- Expérience de déplacement de la testostérone tritiée par le cortisol et l'oestradiol.

Un ml de plasma contenant une faible concentration de



cortisol (traitement par la dexaméthasone) est incubé avec 120.000 dpm/ml de testostérone- ^3H et avec ou sans les stéroïdes non radioactifs. (fig 2).

- a) testostérone- ^3H seule
- b) testostérone- ^3H + 10^{-7} M cortisol
- c) testostérone- ^3H + 10^{-7} M oestradiol

L'électrophorèse a été faite sur gel de polyacrylamide à pH 10,2, T = 7,5%.

On voit que : 1) le cortisol non radioactif sature complètement la CBG qui n'a plus de sites disponibles pour la testostérone- ^3H . Celle-ci ne se lie plus qu'à la seule TeBG.

2) L'oestradiol non radioactif sature complètement la TeBG qui ne possède plus de sites disponibles pour la testostérone- ^3H . Celle-ci se fixe alors exclusivement sur la CBG.

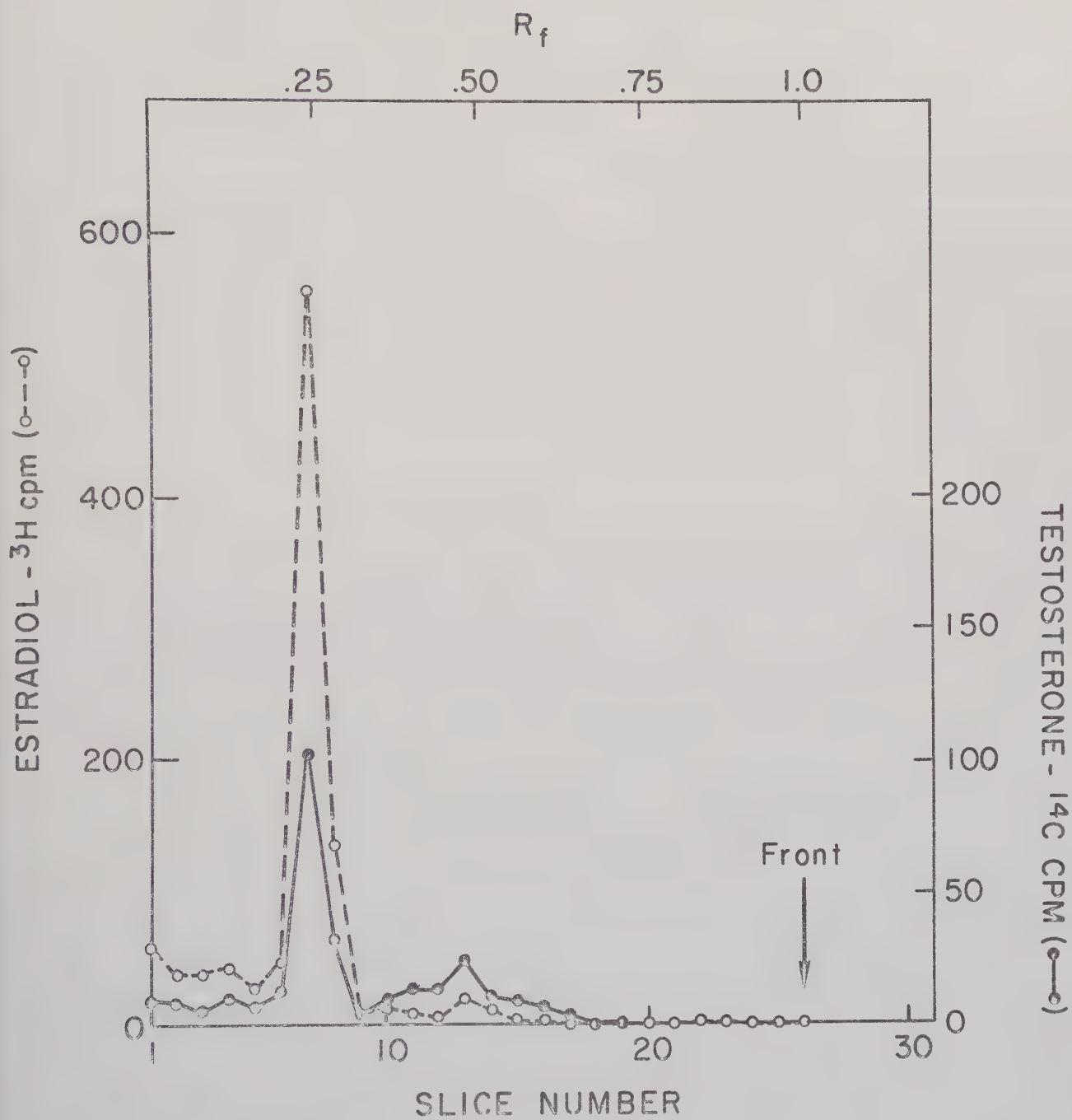
Ces expériences sont intéressantes car elles montrent aisément la compétition sur une protéine spécifique de deux stéroïdes entre eux. Cette situation in vitro peut tout à fait se réaliser in vivo.

III- Démonstration qu'une seule protéine plasmatique, la TeBG, lie à la fois la testostérone et l'oestradiol.

Vous avons démontré que la testostérone et l'oestradiol se lient à une seule protéine, la TeBG, par deux types d'arguments expérimentaux :

1) L'expérience précédente démontre que l'oestradiol et la testostérone non radioactifs déplacent la testostérone- ^3H et l'oestradiol- ^3H de la TeBG.

2) dans deux expériences (fig 3) du plasma de femme traitée aux oestrogènes a été incubé avec des concentrations équimoléculaires



de testostérone- ^{14}C et d'oestradiol- ^3H . Ce plasma a été soumis à l'électrophorèse dans les systèmes B (pH = 10,2) et D (pH = 7,8) à 3 concentrations différentes de gel. Dans tous les gels, alors qu'au départ testostérone et oestradiol sont en concentration équimoléculaire, le rapport molaire testostérone / oestradiol est de 2/1 dans le pic de la TeBG.

L'utilisation de deux systèmes différents et de 3 concentrations démontre qu'une seule protéine lie la testostérone et l'oestradiol dans le plasma car dans toutes ces conditions il n'existait qu'un seul pic de tritium et ^{14}C . En outre, la testostérone est 2 à 3 fois plus affine pour la TeBG que ne l'est l'oestradiol, ce qui est en accord avec les données d'autres auteurs (23, 31). Il faut remarquer que cette expérience de double marquage fut tentée à plusieurs reprises dans le système C (pH 8.8). La liaison de la testostérone- ^{14}C pouvait être facilement démontrée mais non celle de l'oestradiol- ^3H . Cette anomalie ne peut être expliquée par une simple diminution des constantes d'affinité des protéines de liaison dans ce système puisque la liaison de la corticostérone- ^3H à la CBG pouvait y être facilement démontrée ($K_a = 2 \times 10^7 \text{ l/M}$) (42). Il se peut que le système de tampon (cation = N- β -hydroxyéthylmorpholine) puisse interférer sur la liaison de la TeBG au seul oestradiol. Notons au passage que l'oestradiol, tout comme la N hydroxyéthylmorpholine, possède un noyau aromatique : existe-t'il dans ces conditions des forces d'interaction entre l'oestradiol et ce composant du tampon ? . Cette observation sera reprise plus tard dans la discussion.

III- Détermination du "poids moléculaire" et de la valence de la TeBG

a) construction des courbes de Ferguson

La mobilité relative de la TeBG (R_f) a été mesurée dans 7 expériences différentes à pH 7.8, 8.8, 10.2 , à 0°C et dans différentes concentrations de gel. Dans chaque expérience un programme sur ordinateur traçait la droite de régression $\log R_f = f(T)$, droite appelée courbe de Ferguson. Une de ces droites (——) est représentée dans la figure 4 : il s'agit d'une expérience effectuée à pH 8.8 (système C). En ordonnée : $\log R_f$ de la TeBG. En abscisse : concentration totale en acrylamide du gel (T). Le ordinateur trace aussi les 95% de limites de confiance (-----) autour de la ligne. La pente K_R (coefficient de retard de migration) est calculée par le ordinateur ainsi que Y_0 , intersection de la droite avec l'axe des ordonnées pour $T = 0$. Ici $K_R = 0,061$ et $Y_0 = 0,092$.

Dans chaque expérience la pente de la droite de régression et Y_0 ont été calculées et l'ensemble des résultats est résumé dans le tableau III. Le K_R de la TeBG à PH 10,2 a été calculé en utilisant les données des expériences 1-3 puisque les valeurs de K_R dans les expériences individuelles ne varient pas de manière significative. De la même manière, nous avons rassemblé les données des expériences 5 et 6 pour établir le K_R à pH 7,8.

Pour chaque protéine standard, à chaque pH, de telles courbes de Ferguson ont été construites avec un minimum de 5 points et on en a tiré K_R et Y_0 .

b) construction de la courbe $\bar{R}/\sqrt{K_R}$

Le rayon géométrique moyen, $\bar{R}$, de la TeBG, à chaque pH, a été obtenu à partir d'une courbe standard de $\bar{R} = f(\sqrt{K_R})$. La figure 5 montre une telle droite de régression (——) tracée par un programme de ordinateur à pH 8,8 (système C). Ordonnée : rayon géométrique moyen $\bar{R}$; abscisse : $\sqrt{K_R}$. Les protéines stan-

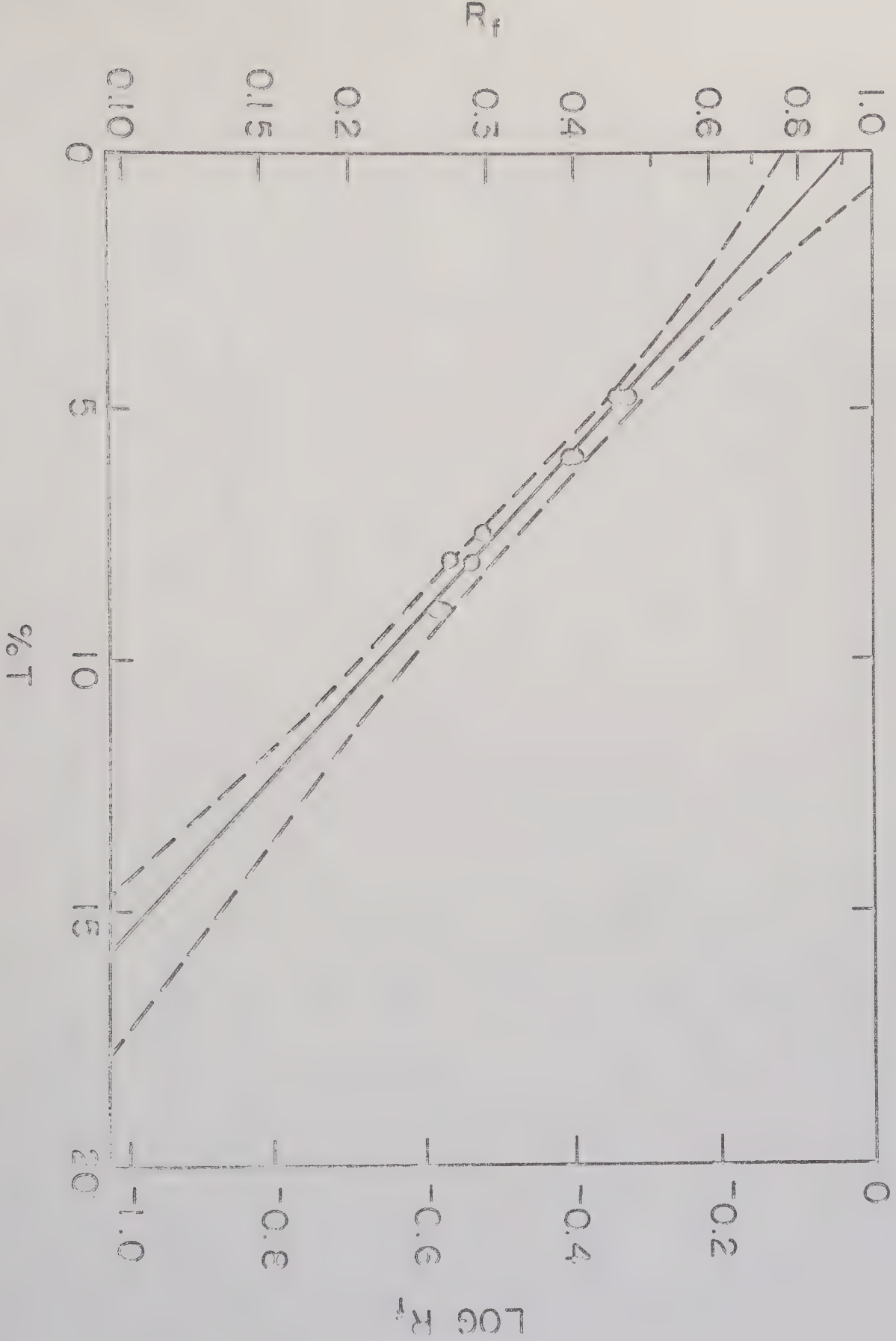
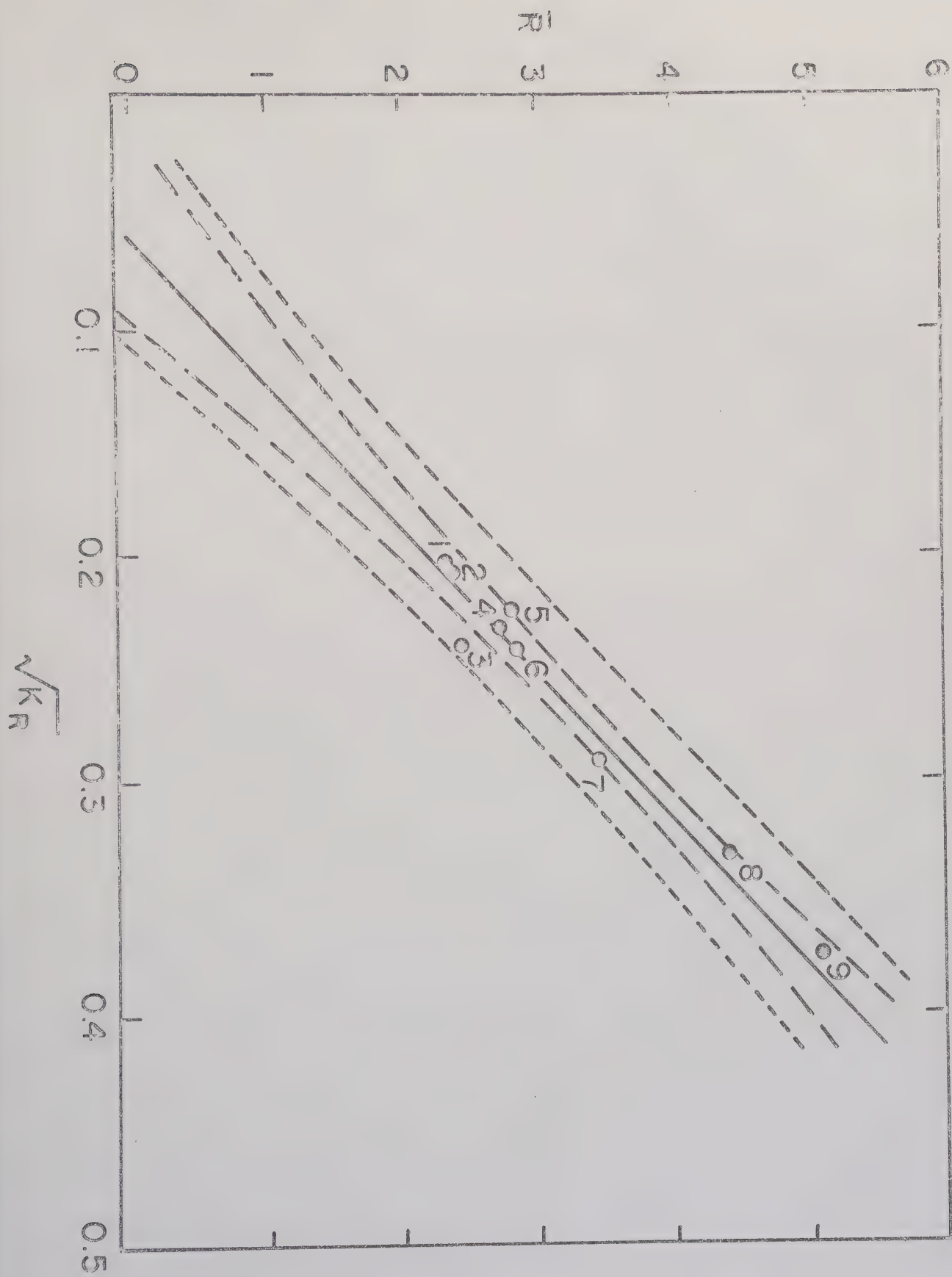


TABLE III

Determination of Retardation Coefficient (K_R) of TeBG at Different pH's

System (0°C)	Experiment Number	N ^(a)	Steroid Label	$K_R \pm SD$
B (pH 10.2)	(1)	3	Estradiol- ³ H	0.078 ± 0.011
	(2)	3	Estradiol- ³ H + Testosterone- ¹⁴ C	0.068 ± 0.012
	(3) (b)	9	Testosterone- ³ H, Testosterone- ¹⁴ C	0.070 ± 0.005
	(1-3) (c)	15		0.071 ± 0.003
C (pH 8.8)	(4) (d)	5	Testosterone- ³ H	0.065 ± 0.005
	(5)	9	Testosterone- ³ H	0.061 ± 0.004
D (pH 7.8)	(6)	3	Estradiol- ³ H + Testosterone- ¹⁴ C	0.060 ± 0.013
	(7)	10	Testosterone- ³ H	0.076 ± 0.006
	(6 + 7) (c)	13		0.070 ± 0.006

The retardation coefficient (K_R) is the slope of the regression line obtained by plotting $\log R_f$ against gel concentration (see Fig. 3). The steroid used to label TeBG is indicated in each experiment; for further details see "experimental procedure". a) number of R_f determinations in each single experiment, b) in this experiment Testosterone-¹⁴C was measured by autoradiography, c) K_R computed from R_f 's found in preceding experiments, d) TeBG freed from endogenous steroids by charcoal (18) was fractionated by PAGE and after electroforesis the whole gel was incubated with testosterone-³H.



dards utilisées dans ce système pour établir la courbe sont :
 1 = pepsinogène, 2 = ovalbumine, 3 = fétuine, 4 = monomère de la Bovine sérum albumin, 5 = dimère de la pepsine, 6 = transferrine, 7 = dimère de la BSA, 8 = phycoerythrine, 9 = ferritine. Les 95% de limites de confiance (-----) pour la courbe standard sont indiqués ainsi que les 95% de limites de confiance pour une seule observation autour de la ligne.(-----)

c) Calcul des différents paramètres physicochimiques

Le tableau IV donne l'ensemble des données obtenues par calculateur pour les 3 systèmes de pH où a été étudiée la TeBG.

- Le rayon géométrique moyen de la TeBG, $\bar{R}$ (m μ) est donné avec la déviation standard. Il est de 2.95 m μ . Le poids moléculaire est tiré de ce rayon en prenant pour volume partiel spécifique celui calculé par Mercier-Bodard et Coll (24) = 0,66. Le "poids" moléculaire moyen ainsi calculé est de 98.000.

- La mobilité électrophorétique libre de la molécule, exprimée en cm/sec/volts/cm est donnée ainsi que la valence (ou charge nette de la protéine). Celle-ci est de -8,5 protons par molécule à pH 10.2, -5,0 à pH 8.8 et -5,9 à pH 7.8.

- La précision et la validité de l'estimation des "poids moléculaires" dépendent de l'exactitude des courbes de Ferguson et de la validité de la pente et de l'intersection sur l'axe des abscisses de la courbe standard $\bar{R} = f(\sqrt{K_R})$. Il faut noter ici que les valeurs des pentes $\Delta \bar{R} / \Delta \sqrt{K_R}$ du tableau III sont en accord raisonnable entre elles et avec celles déjà publiées (36). Il est d'ailleurs normal qu'il existe une variation des pentes puisqu'il existe une variation de K_R suivant des conditions différentes de tampon(36).

TABLE I

Physical Constants of TeBG

System (°C)	Ferguson Plot K_R	$\Delta\bar{R}/\Delta K_R$	Standard Curve $r[mu]$	$R[mu]+SD$	MW	Mobility [cm/sec/ volts/cm]	Charge Valence [net protons/ molecule]
^B (pH 10.2)	-0.071	14.43	-0.91	2.94±0.48	97,100	-6.76	-8.5
^C (pH 8.8)	-0.061	15.87	-0.96	2.96±0.21	99,100	-4.55	-5.0
^D (pH 7.8)	-0.070	17.77	-1.76	2.95±0.19	98,100	-5.24	-5.9

Abbreviations used are defined as following: K_R - retardation coefficient, defined in Table II; Y_0 - intercept of the Ferguson plot with the ordinate (see Fig. 3); $\Delta\bar{R}/\Delta K_R$ - slope of the standard curve in the 3 systems; r - x intercept of the standard curve gives the thickness of polyacrylamide fiber (6); R - molecular radius, defined in Table I; MW - molecular weight.

- En outre la valeur de l'intersection de la courbe standard sur l'axe des x, r ($m\mu$), qui est une mesure de l'épaisseur réelle de la fibre du gel est en bon accord avec la valeur théorique prédite ($0,7 m\mu$).

- Enfin l'excellent accord entre les valeurs des poids moléculaires obtenues dans 3 systèmes de tampon complètement différents accroît encore la confiance dans les estimations du "poids moléculaire".

d - indépendance du rayon moléculaire et du "poids moléculaire" de la TeBG avec la présence de ligand.

Nous avons déterminé par une série d'expériences si la présence ou l'absence de testostérone ou d'oestradiol dans le plasma pouvait influencer le rayon et le "poids moléculaire" de la TeBG, comme cela avait été suggéré par Rosner et Coll pour la TeBG humaine (40) et par Wetsphall et Chader pour la CBG du rat (4). Le plasma a d'abord été débarrassé de ses stéroïdes endogènes en agitant 1 ml de plasma avec 50 mg de Norit A. Cette expérience montrait que l'on pouvait dans ces conditions extraire 99% de la testostérone- H^3 préalablement incubée avec du plasma.

Le plasma ainsi traité est alors soumis à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions habituelles à pH 10.2 (système B), dans différentes concentrations de gel. Puis le gel entier est incubé pendant 10 mn à $37^\circ C$ dans un tampon Tris-HCl contenant de la testostérone- 3H ou de l'oestradiol- 3H . Des expériences préliminaires avaient

indiqué que 10 mn suffisaient pour obtenir un bon repérage de la TeBG sans avoir une diffusion protéique ni un background de radioactivité trop importants. Des incubations du gel pendant 1 ou 2 heures à 4°C donnaient des résultats tout à fait similaires. Les gels sont ensuite lavés rapidement avec 0,5% d'albumine bovine sérique, coupés et la radioactivité de chaque tranche est comptée.

Par cette méthode nous pouvions détecter la liaison de la testostérone- ^3H à la TeBG, à la CBG et à l'albumine facilement (48,49). Le K_R de la TeBG dans ces conditions était identique à celui de la TeBG incubée avec de la testostérone- ^3H avant l'électrophorèse (tableau III). Il faut noter enfin que pour apprécier l'effet éventuel de la Norit A dans l'absorption d'une fraction protéique, deux gels, l'un traité au charbon, l'autre non, ont été soumis à l'électrophorèse. Puis les deux gels ont été colorés par le noir d'amidon et, après décoloration, soumis à un enregistrement de la densité optique (DO) à 280 m μ avec intégration de la DO. Il n'a pas été trouvé de diminution de la DO dans une des bandes protéiques du gel traité par le charbon. Ceci n'exclut pas toutefois la possibilité d'une absorption d'une protéine en faible quantité et non visible sur l'électrophorèse d'un plasma non traité au charbon.

La découverte du même K_R de la TeBG avec ou sans ligand n'exclut pas la possibilité d'une dissociation d'une certaine fraction de la TeBG en sous unité inactive pendant

l'électrophorèse incapable de lier la testostérone- ^3H après l'électrophorèse. Nous concluerons cependant que la taille moléculaire de la majeure partie de la TeBG à 0°C est indépendante de la présence de testostérone ou d'oestradiol.

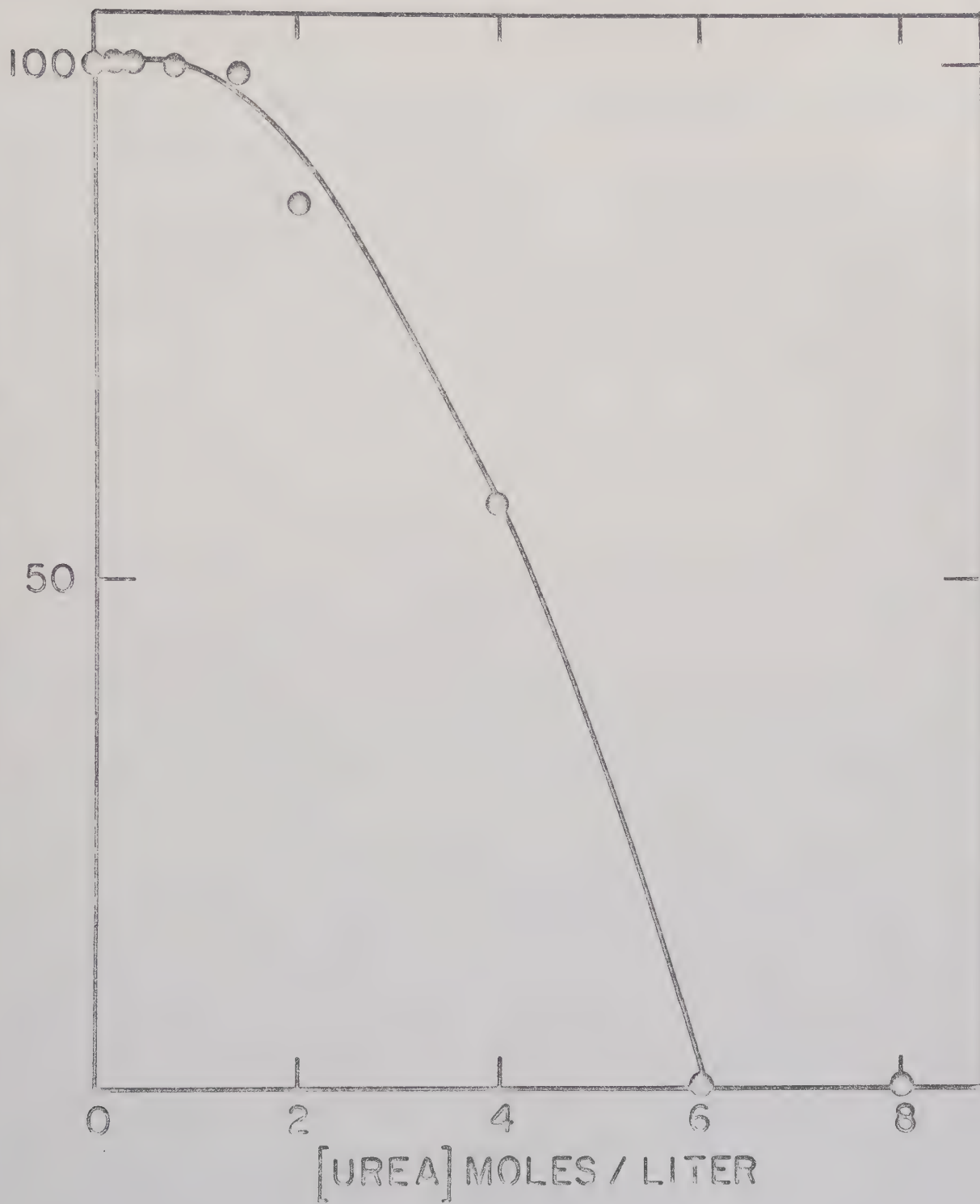
e - Effet de l'urée sur la mobilité électrophorétique de la TeBG.

L'effet de différentes concentrations d'urée sur la mobilité électrophorétique de la TeBG fut étudié pour essayer de dissocier la TeBG en sous unités ou de détacher la TeBG d'une molécule se liant à elle. Des aliquots de plasma sont incubés avec $0.25 \times 10^{-8}\text{M}$ de testostérone- ^3H dans 0.4, 0.8, 1.5, 2, 4, 6 et 8 urée molaire. Chaque échantillon de plasma est ensuite soumis à l'électrophorèse à pH 10.2 dans le système B. Les gels de concentration et de séparation contiennent les mêmes concentrations d'urée que celles utilisées dans les incubations.

La quantité de testostérone- ^3H liée dans le pic de la TeBG sans urée est prise par définition à 100%. La figure 6 montre que la même quantité de testostérone- ^3H est liée dans la TeBG de 0 à 1,5 M. A une concentration 4,0 M d'urée la liaison de la testostérone- ^3H est réduite de 50% et il n'y a plus de liaison décelable de testostérone- ^3H à 6 et 8 M d'urée.

A toutes les concentrations d'urée, de 0 à 4 M, on ne note qu'un seul pic de TeBG qui possède le même Rf que la TeBG migrant en l'absence d'urée. Les résultats peuvent être interprétés comme l'impossibilité - dans ces conditions expé-

% TESTOSTERONE - ^3H BOUND



riméntales - de dissocier la TeBG en deux (ou plus) monomères actifs.

f - Étude des conditions expérimentales de séparation de la TeBG de la transferrine.

La TeBG et la transferrine ont des valences et des rayons moléculaires très voisins. De fait lors des premiers essais de purification de la TeBG par Mercier-Bodard et Coll (), la transferrine apparaissait très proche de la TeBG au sortir des colonnes de Sephadex. Nous avons cherché à séparer ces deux protéines, d'une part pour vérifier la validité des équations proposées dans la section "matériel et méthodes", d'autre part pour proposer les conditions idéales de préparation de la TeBG par électrophorèse préparative sur gel d'acrylamide à pH 7.3.

Pour séparer la TeBG ("A") de la transferrine ("B") dans le système D, pH 7.8, les valeurs utilisées dans l'équation (II) sont :

$$A = 1,52$$

$$B = 1,31$$

$$\alpha = 0,0868$$

$$\beta = 0,0779$$

$$\bar{R}_A = 3,47$$

$$\bar{R}_B = 3,19$$

En utilisant ces valeurs Z fut calculé pour $T = 0$ à $T = 30$ en incréments de 1 (un programme sur calculateur est disponible actuellement pour effectuer cette opération).

L'équation (II) avait un maximum lorsque $T = 18$ et un autre lorsque $T = 0$. En d'autres termes, les meilleures conditions

de séparation de la TeBG et de la transferrine sont soit un gel à $T = 18\%$, soit un gel de séparation à concentration nulle, c'est-à-dire en l'absence de tout effet de tamisage moléculaire, par isoélectrofocusing.

Le plasma d'une femme traitée aux oestrogènes a donc été incubé avec à la fois du Fer^{59} et de la testostérone- ^3H et soumis à une électrophorèse (4 heures) à pH 7.8 dans des gels de concentration variées ($T = 6$ à 18%). Comme il avait été prédit, la TeBG et la transferrine sont complètement séparées dans un gel de $T = 18\%$ (fig 7) et les valeurs de K_R et Y_0 pour les deux protéines sont différentes de manière significative et notées dans le tableau V.

Il est en outre intéressant de noter l'excellent accord obtenu entre les valeurs de K_R obtenues pour la transferrine standard et la transferrine plasmatique marquée au Fer^{59} .

V - Détermination du point isoélectrique de la TeBG.

Le point isoélectrique de la TeBG a été obtenu par isoélectrofocusing sur gel de polyacrylamide comme support ($T = 3,5\%$, $C = 4\%$) pour éviter les effets de tamisage moléculaire.

Des expériences préliminaires avaient montré que :

a) la protéine ne perdait pas son activité de liaison lors d'un isoélectrofocusing prolongé (13 h).

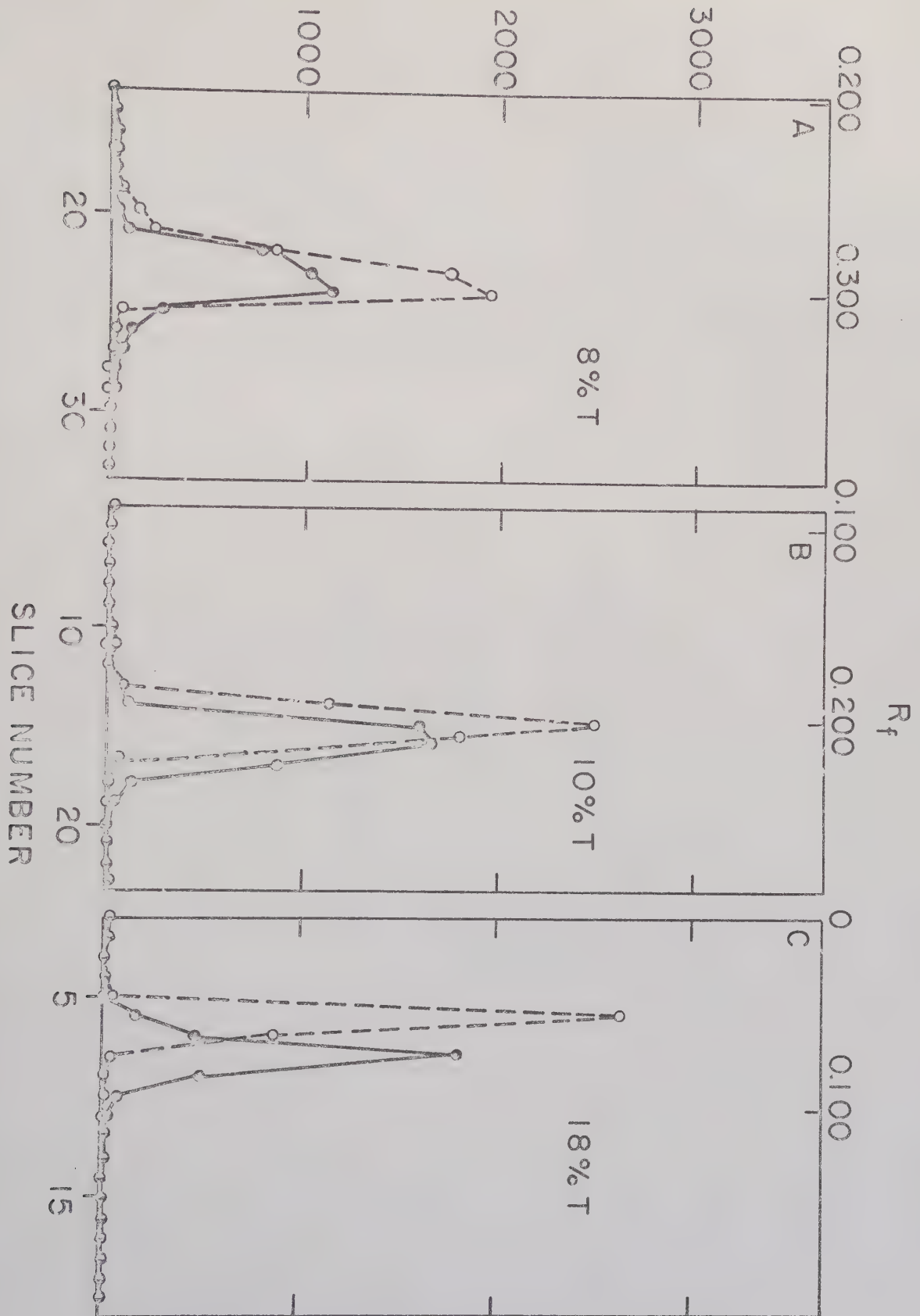
TABLE IV

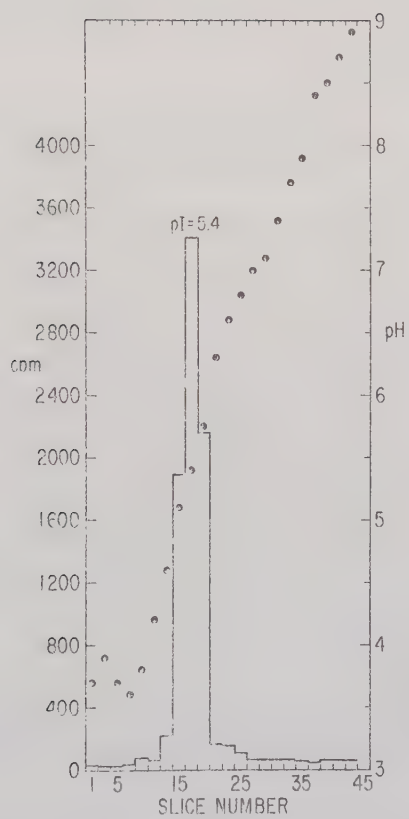
Comparison of K_R and Y_O of TeBG and Transferrin in System D (pH 7.8)

Protein	Protein Source	Protein Identification	$K_R \pm SD$	$Y_O \pm SD$
Transferrin	Plasma (a)	$^{59}\text{Fe}^{++}$	-0.062 ± 0.008	1.01 ± 0.07
	Pure (b)	Stain	-0.065 ± 0.004	1.14 ± 0.03
TeBG	Plasma (a)	Testosterone- ^3H	0.072 ± 0.008	1.20 ± 0.06
	Plasma (c)	Testosterone- ^3H	0.070 ± 0.006	1.29 ± 0.04

- a) Human pregnant plasma incubated with both testosterone- ^3H and $^{59}\text{Fe}^{++}$ as described in "experimental procedure".
 b) Standard transferrin
 c) Values from experiments 6 + 7, Table II.

COUNTS / MINUTE





b) le point isoélectrique était stable après 9 h de focusing.

Dans ces conditions, le point isoélectrique trouvé est de 5,4 au cours d'une expérience menée en duplicata (fig 8). Il n'existe qu'un seul pic d'activité de liaison de la testostérone : la TeBG. Lors de la même expérience, le point isoélectrique de la CBG est de 5,0.

VI - Courbe de titration de la TeBG

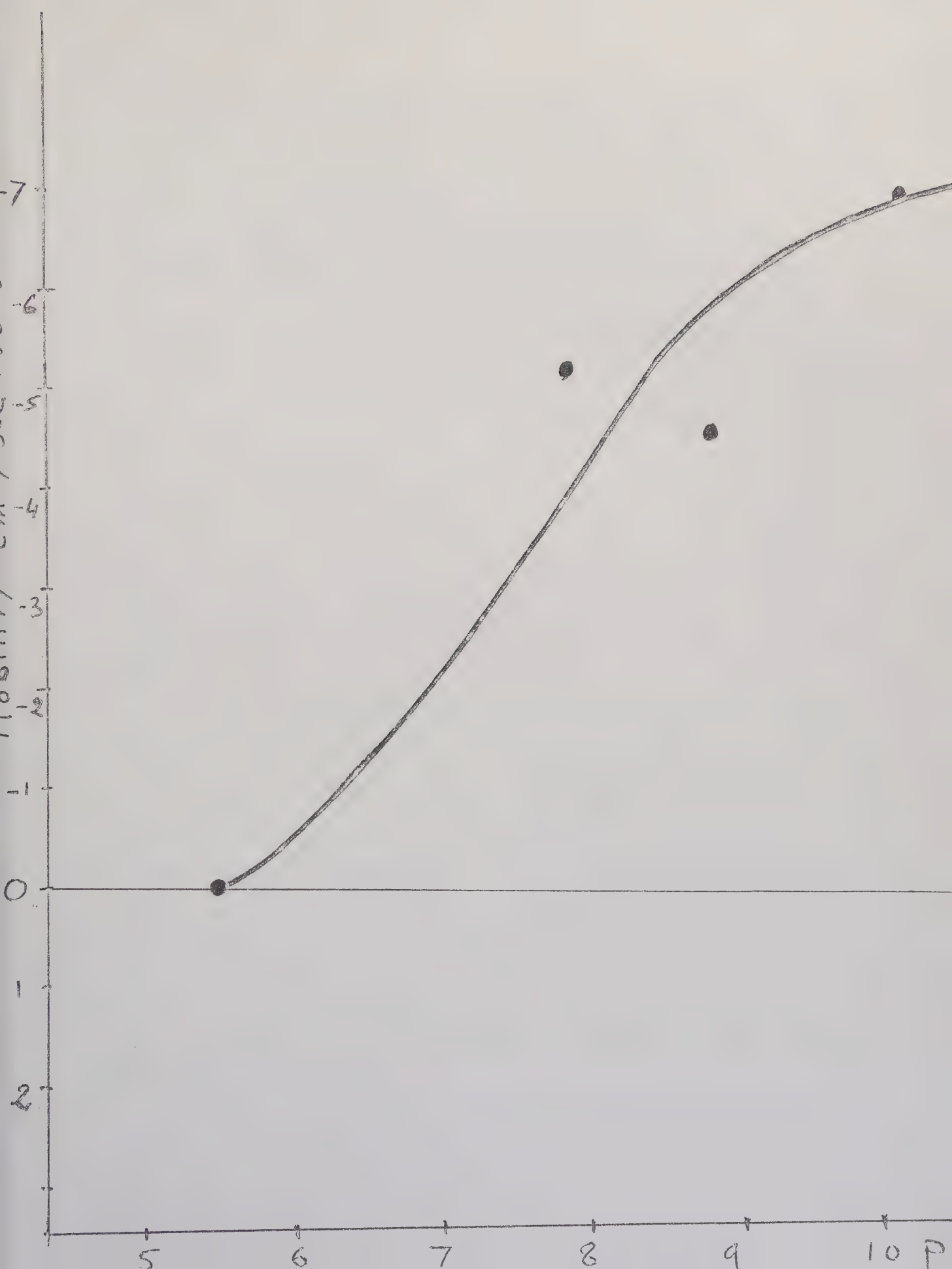
Les mobilités électrophorétiques de la TeBG en $\text{cm}^2/\text{sec/volts}$ sont notées en ordonnées, en fonction du pH noté en abscisse. Au pH isoélectrique de la TeBG, sa mobilité électrophorétique = 0. On possède ainsi une courbe de titration (fig 9).

Bien que cette courbe ne possède que quatre points, on note qu'à pH 8.8, il existe un point en dehors de la courbe, car trop bas situé. Cette anomalie sera discutée ultérieurement.

VII - Détermination de la capacité de liaison de la TeBG

On a vu que par électrophorèse sur gel de polyacrylamide on sépare facilement et nettement la TeBG des autres protéines vectrices de la testostérone : CBG et albumine. Par ailleurs, le stéroïde non lié aux protéines ne pénètre pas dans le gel. Il était donc possible d'estimer la capacité totale de liaison de la TeBG grâce à de la testostérone- ^3H d'activité spécifique connue et à condition que :

- 1) La TeBG puisse être saturée



2) le stéroïde ne se dissocie pas de façon significative durant l'électrophorèse afin que la protéine reste toujours en état de saturation.

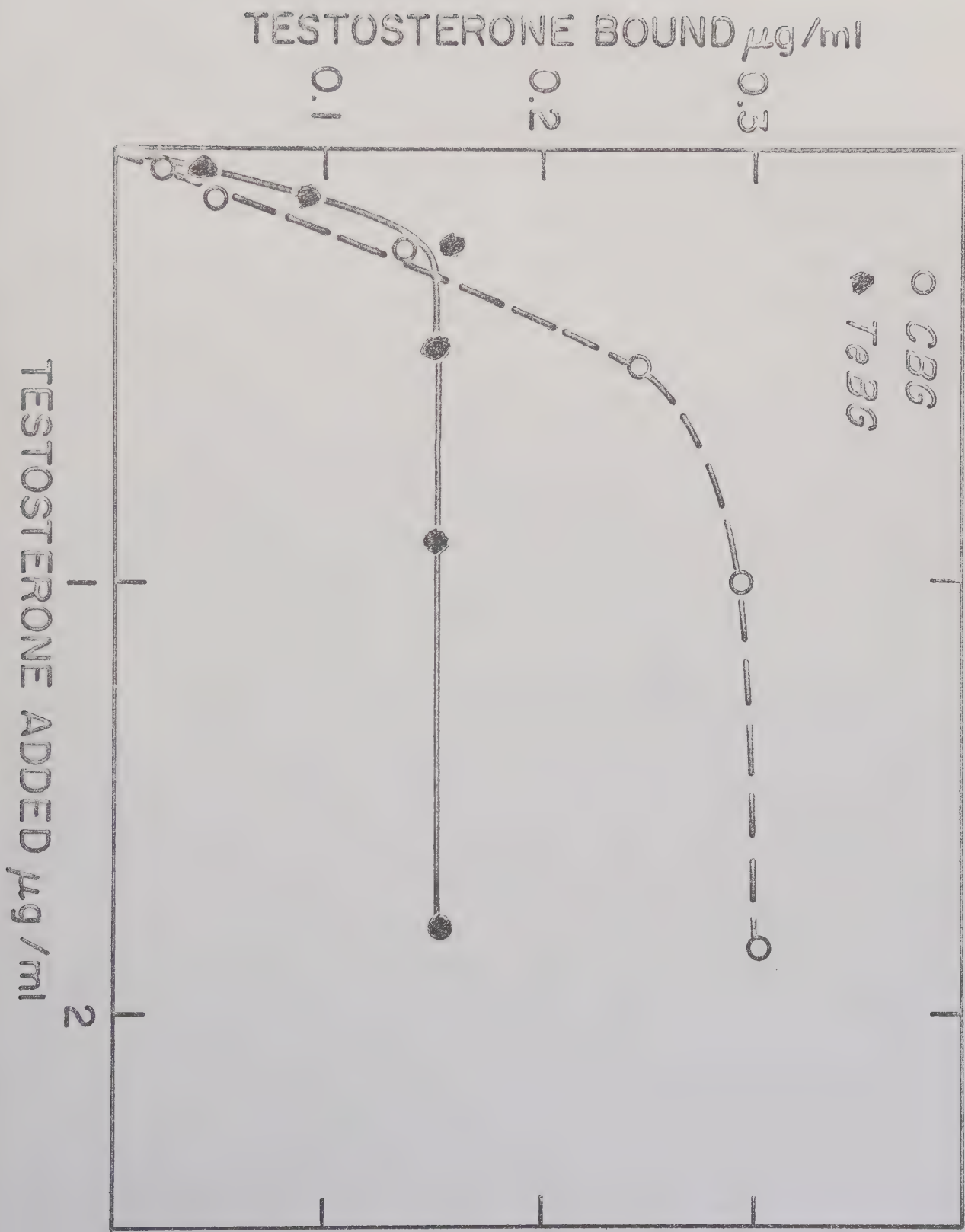
a) courbe de saturation de la TeBG

On a traité du plasma provenant d'une femme recevant des oestrogènes par la NORIT A de façon à éliminer les stéroïdes endogènes. Puis des aliquots de ce plasma ont été incubés avec des quantités croissantes de testostérone et la quantité de testostérone liée à la TeBG (—●—●—●—) et à la CBG (—○—○—○—) est mesurée (fig 10). L'électrophorèse a été faite dans le système B, à pH 10.2. On voit que la TeBG est saturée lorsque la quantité de stéroïde présent est approximativement égale à deux fois la capacité de liaison (15μ g/100 ml).

Ceci a été vérifié à maintes reprises, avec la testostérone et la 5α -DHT dans des plasmas d'hommes et de femmes normaux ou pathologiques. Bien que les conditions de saturation de la CBG avec la testostérone n'aient pas été étudiées de façon exhaustive, la concentration de stéroïde requise pour saturer la CBG est considérablement plus grande que celle pour saturer la TeBG (fig 10).

b) absence de dissociation du stéroïde de la TeBG durant l'électrophorèse

Pour valider cette méthode, il était nécessaire de prouver que le stéroïde ne se dissociait pas de manière signi-



ficative de la TeBG durant l'électrophorèse. Pour ce faire, six échantillons de plasma, avec des différentes capacités de liaison, sont incubés avec une dose saturante de testostérone- ^3H et sont déposés sur des gels en deux exemplaires identiques. Une série de gels migre pendant 2 heures et une autre est soumise à 4 heures d'électrophorèse.

Dans les deux séries de gels, la TeBG migrait de 11 et 21 mm respectivement et la quantité de testostérone liée à la TeBG est la même aux deux temps (tableau VI). Ceci est donc une preuve que la dissociation de la testostérone de la TeBG est négligeable. Cependant lorsque l'électrophorèse est faite à 25°C , 25% de la testostérone- ^3H se dissocie de la TeBG.

Ces études indiquent que la capacité de liaison de la TeBG peut être mesurée en utilisant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 0°C pour séparer le ligand libre de celui qui est lié spécifiquement à la TeBG.

c) Calcul de la capacité de liaison

Malgré l'absence de dissociation significative du stéroïde de la TeBG, nous avons noté qu'il existait une certaine quantité constante de radioactivité distribuée dans le gel de cart et d'autre de la TeBG.

L'origine de cette radioactivité est en fait une dissociation du stéroïde lié à l'albumine ou à la CBG. Les conditions d'étude de la capacité de liaison sont en effet des conditions de saturation : incubation du plasma avec 3 à 4 fois

TABLE VI

Testosterone Bound to TeBG after
Electrophoresis for 2 and 4 Hours

Plasma Number	cpm in TeBG	
	After 2 hrs.	After 4 hrs.
1	73	75
2	1423	1369
3	616	617
4	8138	8294
5	455	477
6	679	610

la quantité de stéroïde correspondant à la capacité de liaison présumée. Le stéroïde non lié à la TeBG se lie alors à l'albumine ou à la CBG. Dans le cas de la testostérone, ce stéroïde se lie à la CBG et se dissocie de cette protéine durant l'électrophorèse. Pour l'oestradiol, la figure (1) avait montré qu'il existait une dissociation continue durant le temps de migration. Dans le cas de la 5α -DHT, l'excès de stéroïde se lie à l'albumine. Ceci fut démontré en incubant à la fois du plasma et de l'albumine humaine (en même concentration que dans le plasma) avec des quantités égales de 5α -DHT³H. On voit qu'il y a une liaison faible, mais certaine, de la 5α -DHT sur l'albumine : cette liaison est responsable, en majeure partie, des cpm retrouvés de part et d'autre de la TeBG. Nous avons considéré ultérieurement que cette radioactivité était un background non spécifique dont il fut tenu compte dans le calcul de la capacité de liaison de la TeBG (cf plus loin).

Le bruit de fond fut réduit au minimum :

- 1) en utilisant une concentration de méthylène-bisacrylamide dans le gel de concentration de 2% au lieu de 20%.

- 2) en utilisant un minimum de gel de concentration et de séparation pour obtenir une séparation parfaite de la TeBG des autres protéines de liaison.

- 3) en utilisant la 5α -DHT comme ligand plutôt que la testostérone. En effet ce stéroïde a une constante d'affinité

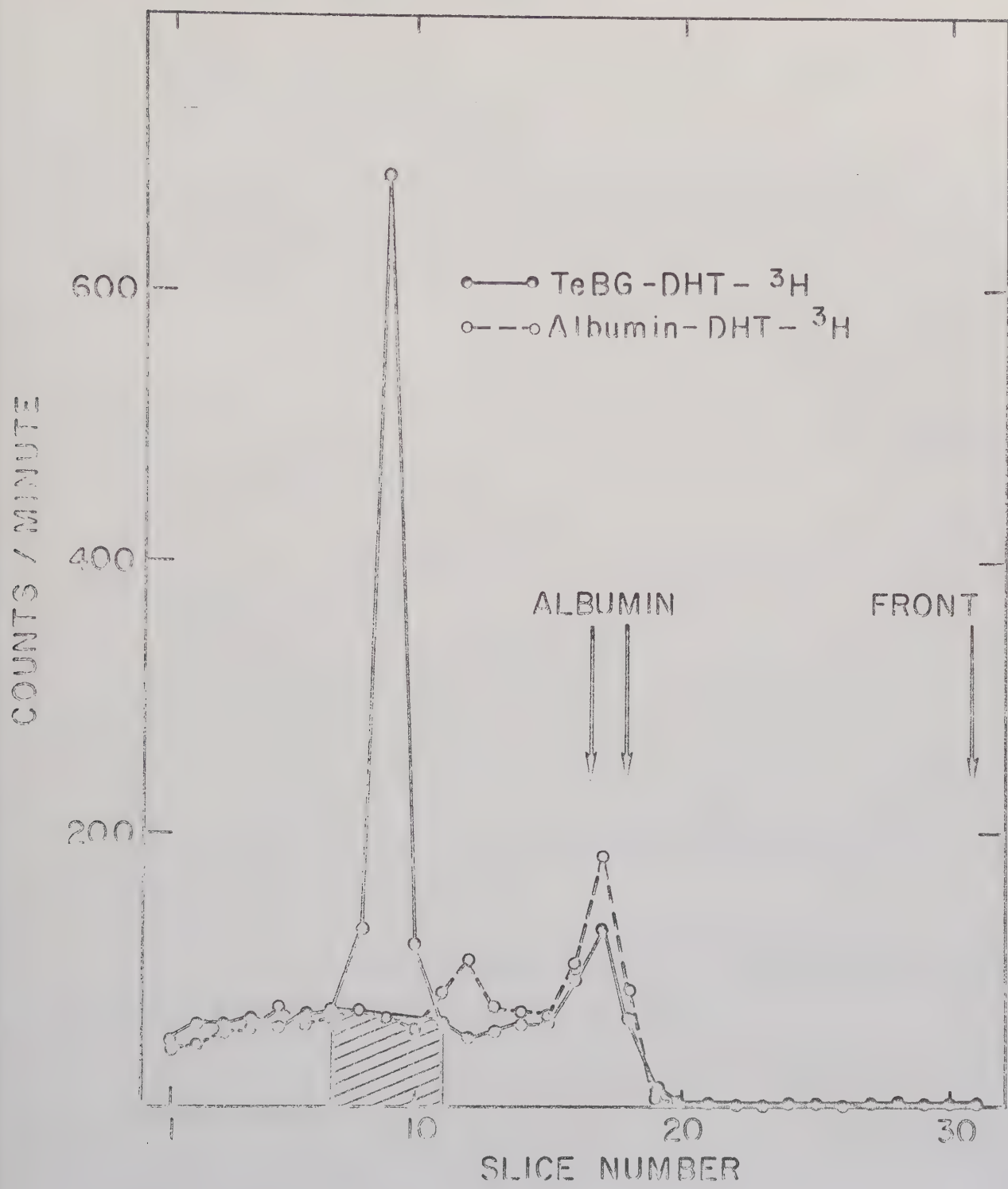
supérieure à celle de la testostérone pour la TeBG (19,24). Nous avons vérifié ce fait en calculant la constante d'affinité de la 5 α -DHT pour la TeBG par gel de polyacrylamide : nous avons trouvé une constante d'affinité 2 à 3 fois supérieure à celle de la testostérone. En utilisant ainsi la 5 α -DHT le bruit de fond passe de 75-100 cpm/tranche de gel pour la testostérone à 75-50 cpm.

La réduction du bruit de fond était essentielle pour l'estimation de la capacité de liaison de la TeBG chez l'homme puisque les comptes attribuables à l'albumine comprennent une fraction significative des cpm totaux du pic de la TeBG (fig 11).

Exemple pratique de calcul de la capacité de liaison de la TeBG (fig 11)

100 μ l de plasma d'un homme normal sont incubés avec 1×10^{-8} M de 5 α -DHT et 60.000 cpm de DHT- 3 H. Après 30 mn d'incubation à 25°C, le plasma est dilué au 1/5 par le tampon du gel supérieur puis le mélange est dilué au 1/2 par du sucrose à 50%. Après refroidissement à 4°C, l'échantillon est soumis à l'électrophorèse (système B, pH 10.2). Gel de concentration : T = 3,5%, C = 2% ; gel de séparation : T = 8%, C = 2%.

Le bruit de fond pour le pic de TeBG est déterminé en prenant la moyenne des cpm par tranche de gels dans 4 tranches de chaque côté du pic de TeBG, multiplié par le nombre de tranches dans le pic de la TeBG. La capacité de liaison de la TeBG, BC, exprimée en μ g de stéroïde par 100 ml de plasma est alors calculée :



$$BC = \frac{\Sigma - b}{SA} \times \frac{100}{V} \quad (13)$$

ou Σ = nombre total de cpm dans le pic de TeBG

b = background du pic

SA = activité spécifique du réactif stéroïdien en cpm/ μ g

V = volume du plasma appliqué au gel.

Ici la capacité de liaison est de 0,67 μ g/100 ml ($2,3 \times 10^{-8}$ M).

d) Effet des réactifs stéroïdiens, des stéroïdes plasmatiques endogènes, du pH et de la dilution du plasma sur la capacité de liaison de la TeBG.

1° détermination de la capacité de liaison avec différents stéroïdes

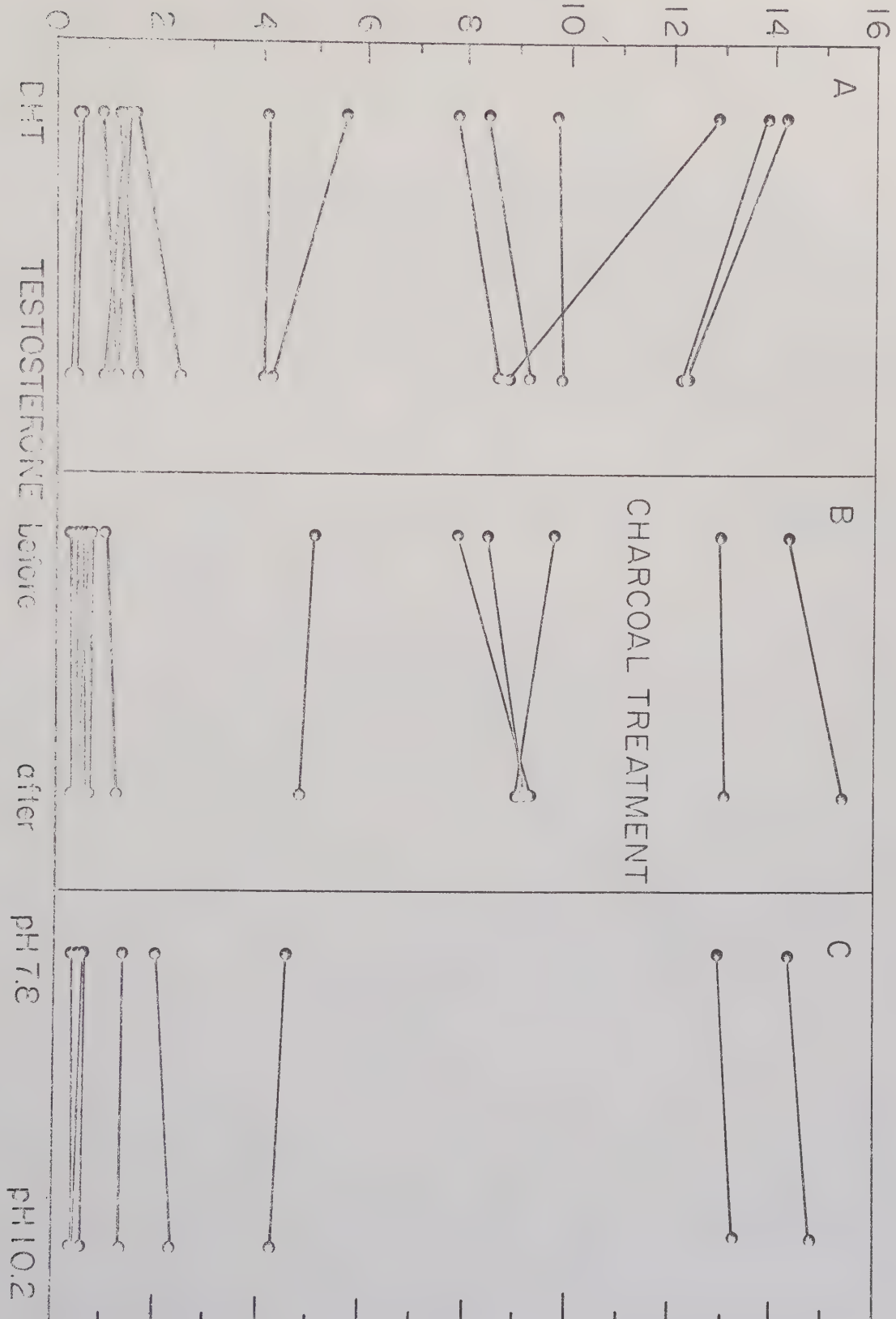
La figure 12 a montre que la capacité de liaison de la TeBG déterminée par la DHT- 3 H ou la testostérone- 3 H est la même dans les échantillons plasmatiques des hommes et des femmes normaux. Toutefois, les valeurs trouvées avec la DHT- 3 H sont plus hautes que celles trouvées avec la testostérone- 3 H chez les femmes enceintes.

2° Effet de l'extraction des stéroïdes endogènes par le charbon sur la capacité de liaison.

Lorsque les stéroïdes endogènes des femmes enceintes sont extraits par de la Norit A, la capacité de liaison de la TeBG est la même, qu'elle soit mesurée avec la DHT ou la testostérone (fig 12 b).

Ces études suggèrent que le plasma de femme enceinte

BINDING CAPACITY μg OF STEROID BOUND/100ml



contient une (ou des) substance qui entre partiellement en compétition avec la testostérone, mais non avec la DHT, sur le site de liaison du stéroïde de la TeBG.

3° Influence du pH sur la capacité de liaison

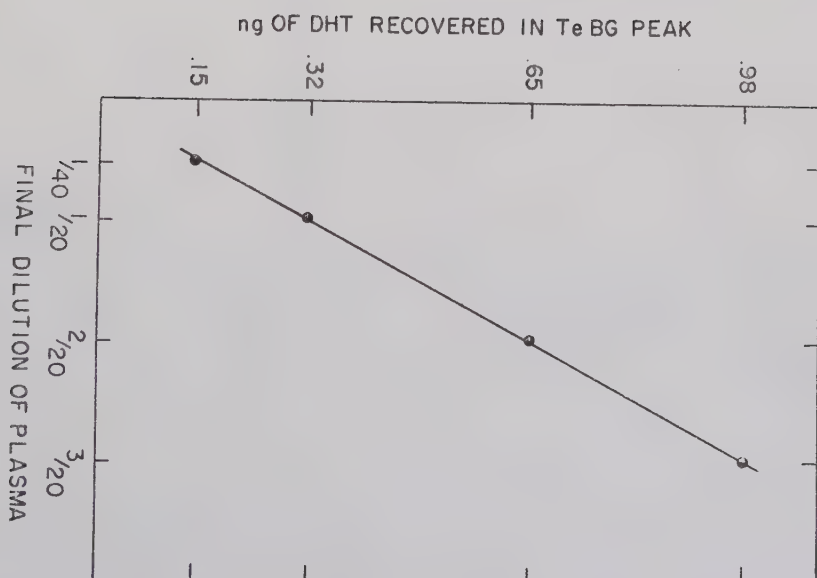
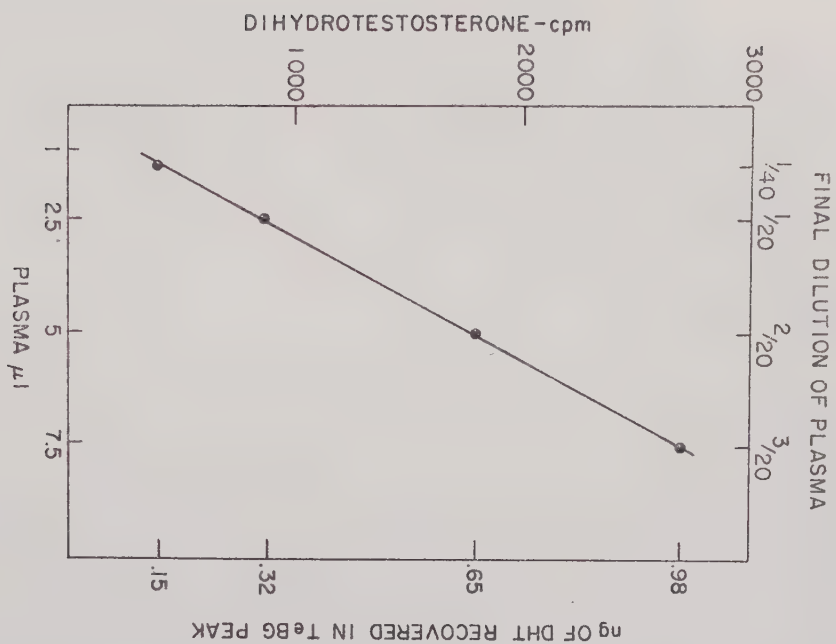
La figure 12 c montre que la capacité de liaison ne varie pas, qu'elle soit mesurée à pH 7,8 (système D) ou à pH 10,2 (système B). Ces résultats confirment des études antérieures qui avaient montré que l'affinité relative de liaison était la même entre pH 6 et 10 (19).

4° Effet de la dilution du plasma sur la détermination de la capacité de liaison

Des aliquots d'un plasma de femme enceinte, plasma débarrassé de ses stéroïdes endogènes par la Norit A, sont dilués à 3/20, 1/10, 1/20, et 1/40. Les aliquots sont incubés avec la 5α -DHT- ^3H ($2,5 \times 10^{-8}\text{M}$) dans un volume final de 1 ml. 50 μl de chaque aliquot est alors soumis à l'électrophorèse. La quantité de DHT liée est directement proportionnelle à la concentration plasmatique (fig 13). Ceci indique que la capacité de liaison de la TeBG peut être mesurée avec précision dans un plasma dilué jusqu'à 6 fois.

VIII Valeurs normales

Les valeurs normales de la capacité de liaison de la TeBG plasmatique déterminées avec la 5α -DHT- ^3H sont données dans la figure 14.



TESTOSTERONE BINDING CAPACITY

$\mu\text{g OF DHT / 100 ml}$

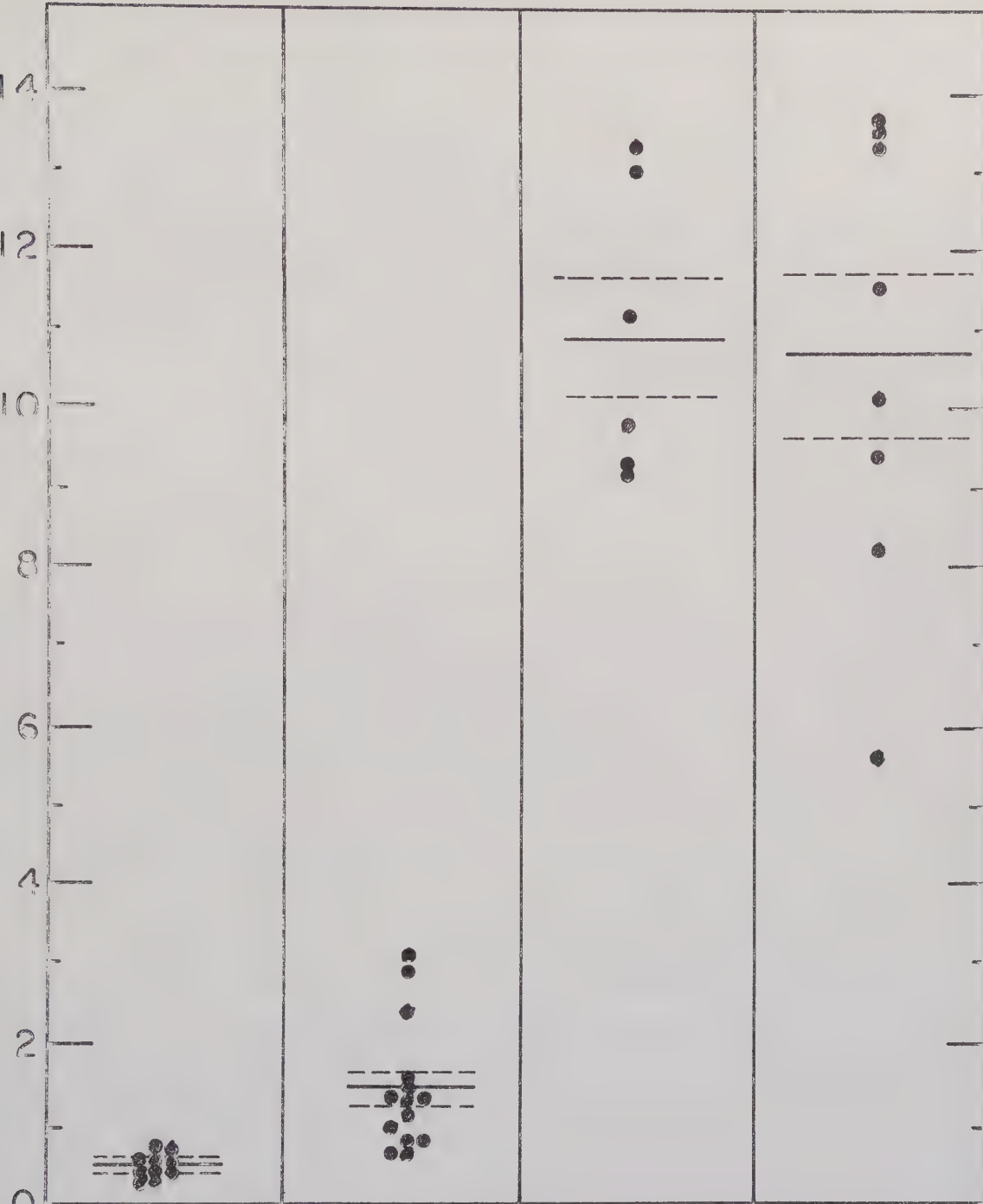


NORMAL
MALE

NORMAL
FEMALE

PREGNANT
FEMALE

ESTROGEN
TREATED
FEMALE



Hommes (10) : $0,49 \pm 0,04$ (ESM)* μg de stéroïde/100 ml

Femmes (14) : $1,42 \pm 0,22$

Femmes traitées aux oestrogènes (8) : $10,70 \pm 1,04$

Femmes enceintes (6) : $10,91 \pm 0,74$

Garçons prépubères (6) : $3,04 \pm 0,45$

Filles prépubères (7) : $2,20 \pm 0,45$

Il existe une différence sexuelle entre l'homme et la femme : les taux de TeBG de l'homme sont significativement ($P < 0,01$) plus bas que ceux de la femme. Par contre, il faut noter qu'avant la puberté, il existe des taux comparables, chez le garçon ou la fille, de la TeBG. Les taux sont plus élevés que ceux de la femme pubère. Il y a une augmentation de 2 fois de la valeur de la capacité de liaison de la TeBG durant la grossesse ou le traitement oestrogénique.

IV Valeurs pathologiques

Dans une série privilégiée de 13 testicules fémininisants, n'ayant reçu aucun traitement médical ni chirurgical, la moyenne des TeBG est discrètement supérieure à celle de la femme : $1,63 \pm 0,13$ (cf p. 47). La TeBG du testicule féminisant répond par ailleurs aux oestrogènes : dans 3 cas de testicules fémininisants traités aux oestrogènes, la TeBG est de $4,28 \pm 0,86$.

Par contre, il est très intéressant de noter que dans 3 cas de pseudohermaphrodisme mâle (sans signes de féminisation

* ESM = erreur standard de la moyenne

comme dans le cas du testicule féminisant), la TeBG est au niveau de l'homme : $0,63 (\pm 0,21)$.

Dans plusieurs cas non publiés avec Bardin, nous avons trouvé chez des femmes hirsutes des valeurs de TeBG intermédiaires entre celles de l'homme et de la femme (0,80).

Enfin nous pouvons confirmer les travaux de Dray (9,10), de Vermeulen (49) et Olivo (28) sur l'influence de l'hyperthyroïdie dans l'élévation de la TeBG. Dans un protocole effectué par les Drs Lipsett, Mahoudeau et Ruder (41), nous avons montré que l'administration de $300 \mu\text{g}$ par jour de triiodothyronine (LT_3) pendant 3 semaines à 3 hommes normaux entraînait une augmentation de 7 fois de la TeBG et une augmentation de deux à trois de la testostérone plasmatique. Notons qu'au cours de cette étude nous avons apprécié la demi-vie de la TeBG in VIVO après l'arrêt de la T_3 : cette demi-vie est de l'ordre de 5,1 jours.

DISCUSSION

Nous centrerons cette discussion sur deux points : d'une part, l'apport de la méthodologie nouvelle des protéines de liaison par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, d'autre part, l'importance de la TeBG dans le transport plasmatique des androgènes et son rôle dans le métabolisme et le mode d'action des stéroïdes sexuels.

I Discussion des caractéristiques physico-chimiques de la TeBG

Les protéines de liaison des stéroïdes dans le plasma et les organes cibles ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années en raison de leur rôle possible dans le transport du stéroïde et son mode d'action. Les informations quantitatives sur les interactions stéroïde-protéines dans les liquides biologiques requièrent généralement des moyens physico-chimiques complexes, prenant du temps, sur des échantillons au moins partiellement purifiés. Il était donc souhaitable de développer des procédés qui faciliteraient l'analyse des protéines de liaison des stéroïdes. Dans le travail présent, nous avons utilisé une méthode simple, l'électrophorèse de gel de polyacrylamide qui s'est révélée être un outil précieux.

Cette technique permet la séparation, la caractérisation physico-chimique et la mesure de la TeBG. Outre l'avantage de la simplicité, cette technique permet de travailler sur des

petites quantités de protéines seulement. Une purification initiale n'est pas utile, et un grand nombre d'échantillons peut être effectué rapidement. La facilité avec laquelle l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a pu être appliquée à la TeBG suggère que cette technique peut être généralement utile pour l'étude d'autres interactions ligand-protéine.

1) Poids moléculaire

Le premier auteur qui a utilisé la relation linéaire existant entre le logarithme de la mobilité relative d'une protéine en fonction de la concentration d'un gel d'amidon est Ferguson (12). Il a aussi démontré la relation linéaire existant entre le coefficient de retard de migration en gel d'amidon (K_R en gel de polyacrylamide) et le coefficient de distribution sur séphadex G 100. Il montrait aussi dans cet article que "la mobilité relative à une concentration nulle de gel d'amidon et le coefficient de retard de migration sont des fonctions respectivement de la charge nette de la molécule et de sa taille moléculaire". La relation linéaire proposée par Ferguson pour la détermination du poids moléculaire était $K_R = f(M_w)$.

Hedrick et Smith (17) ont, ainsi que Morris (Protides Biol. Fluids, 14, 543, 1963) appliqué ces notions à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ces auteurs ont bien montré que des protéines isomères au point de vue charge donnent dans les courbes de Ferguson des familles de droites non parallèles que l'on peut extrapoler à un point commun pour

une concentration de 0% de gel. Par contre, des protéines isomères au point de vue taille donnent des droites parallèles. Enfin des protéines différant à la fois par la charge et la taille donnent des droites non parallèles se coupant à un point autre qu'une concentration de 0% de gel.

Depuis ces travaux initiaux, plusieurs auteurs ont (3) développé la théorie et la pratique du gel de polyacrylamide pour la mesure des poids moléculaires. Ces travaux sont revus dans le travail de synthèse d'A. Chrambach et D. Rodbard (6,36). Ces auteurs ont montré, ainsi que nous l'avons fait dans cette étude, que la relation linéaire entre $\sqrt{K_R}$ et le rayon moléculaire, $\bar{R}$, qui a été prédite théoriquement (37) est vérifiée dans des conditions variées.

Les protéines traitées avec le sodium-dodécyl-sulfate (SDS) forment des pelotes statistiques avec une mobilité électrophorétique pratiquement constante (M_0 et V_0). Ceci est lié à l'environnement de la protéine par les charges négatives du dodécyl sulfate. Dans ces conditions, il existe une relation linéaire entre le R_f et le log du poids moléculaire, et le "poids moléculaire" peut ainsi être calculé par une seule mesure de R_f (50)11).

La méthode de Chrambach et de Rodbard que nous avons utilisée ici, bien que plus complexe, offre cependant plus d'avantages.

La détermination de plusieurs paramètres physico-chimiques à partir des R_f dans l'électrophorèse sur gel de

polyacrylamide a été facilitée par l'utilisation de programmes de calculateurs (36) ; ceci permet une analyse rapide des données et permet l'estimation de 95% de limites de confiance, un paramètre qui n'est pas habituellement donné dans les estimations de poids moléculaire et de valence.

Les limites de confiance des calculs des propriétés physiques dépendent des 95% de limites de confiance de K_R pour à la fois la TeBG et les protéines standards. K_R est à son tour dépendant du nombre et de la précision des valeurs de R_f utilisées pour calculer les K_R .

C'est ainsi qu'il est possible de reconnaître un polymère par sa taille qui est n fois celle du monomère (n = nombre entier) et aussi par l'existence d'un rapport charge/poids moléculaire constant. Ceci a été particulièrement net dans un travail que nous avons fait avec M. Sherman et B.W. O'Malley sur le récepteur cytosolique de la progestérone (43).

Différence des poids moléculaires obtenus suivant la présence ou l'absence de purification de la TeBG

Le poids moléculaire de 98.000 obtenu dans ce travail par électrophorèse sur gel de polyacrylamide est en bon accord avec les valeurs rapportées pour la protéine active plasmatique ou partiellement purifiée. Gueriguian et Pearlman (15) ont estimé par chromatographie sur Sephadex un rayon de Stokes (R_s) de 4,4-4,7 $m\mu$ correspondant à un poids moléculaire de 98.000 à 115.000. La différence entre ce rayon de

Stokes et l'équivalent géométrique du rayon que nous avons déterminé ($R = 2,95 \text{ m}\mu$) est liée à la différence de signification de ces rayons. Le rayon de Stokes tient compte de l'asymétrie et de l'hydratation de la molécule, ce qui n'est pas le cas pour le rayon géométrique moyen. Le fait que le rapport $R_s/\bar{R}$ soit supérieur à 1,00 indique que la TeBG n'est pas sphérique et qu'elle est hydratée. Rosner et Coll ont aussi trouvé un poids moléculaire de 115.000 par filtration sur Sephadex G-200 pour la TeBG plasmatique et de Moor 100.000 sur Sephadex. Enfin Mercier et Baulieu avaient rapporté en 1968 (22) que la TeBG partiellement purifiée et chromatographiée sur Sephadex G-200 était éluée juste avant le pic de la transferrine, ce qui indiquait un poids moléculaire plus grand que celui de la transferrine (74.000 Roberts et Coll, J. Biol. Chem., 241, 4907, 1966).

Ces résultats diffèrent beaucoup de ceux obtenus sur des préparations purifiées. Mercier-Bodard et Coll (24) ont purifié la TeBG en partant de la fraction IV de Cohn et après purification par chromatographie par échange d'ion et par Sephadex, ont obtenu une protéine ne comportant qu'une bande par ultracentrifugation. La protéine purifiée liait la testostérone- ^3H sur électrophorèse en gel de polyacrylamide, mais avait une mobilité électrophorétique bien supérieure à celle de la TeBG plasmatique. Le poids moléculaire estimé par sédimentation à l'équilibre à 20°C était de 52.000. Ce poids moléculaire est en accord avec celui de 50.000 trouvé par P.

Cuatrecasas* pour la TeBG purifiée par chromatographie par affinité. La mesure du poids moléculaire a été faite sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium.

Le fait que la fraction de poids moléculaire 50.000 puisse lier le stéroïde suggère , soit que la TeBG existe dans le plasma sous forme de dimère qui serait dissocié durant la purification, soit que la purification détache la TeBG d'une protéine porteuse de poids moléculaire voisin. Une telle possibilité a été décrite pour une thyroxine binding protein (20) et pour la protéine liant le rétinol (34). Cette dernière protéine circule dans le plasma sous la forme d'une complexe protéine-protéine, étant liée à la préalbumine.

Nos efforts pour identifier un poids moléculaire de 50.000 correspondant à une TeBG active dans des gels contenant de 1 à 4 M d'urée n'ont pas été fructueux. La possibilité d'une dépendance de K_R (et donc de la taille moléculaire) de la TeBG avec les différents types de préparation de cette protéine reste donc à explorer.

Indépendance du poids moléculaire avec la présence ou l'absence de ligand

La CBG purifiée de rat se dissocie en 4 sous unités distinctes, visibles à l'ultracentrifugation, lorsqu'on enlève son ligand et se réassocie après l'addition de corticostérone

* P. Cuatrecasas : communication personnelle.

(4). Rosner et Coll (40) ont montré aussi que la TeBG partiellement purifiée pouvait s'aggréger pour former un complexe protéique plus important lorsqu'on enlève l'oestradiol. Ces auteurs ne pouvaient pas, toutefois, trouver cette forme polymérique de la TeBG dans le plasma entier. Dans ce travail nous avons vu qu'il n'y avait pas d'arguments pour une modification du poids moléculaire de la TeBG lorsqu'on retire 99% du ligand par la Norit A.

2) Valences - courbe de titration

Nous avons vu qu'à partir des valences du tableau IV et du point isoélectrique (fig 8) on pouvait dresser une courbe de titration (fig 9). La valeur obtenue à pH 8.8 (système C) n'est pas en accord avec celles obtenues à pH 10.2 et 7.8. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'albumine bovine sérique et l'ovalbumine: la valence du système C est en dehors de la courbe connue de titration de ces protéines (36). Dans tous ces cas, la valence est moins élevée que celle attendue et il n'est pas exclu qu'il s'agisse d'un phénomène d'enfouissement des groupes carboxyliques ionisés de la molécule par ce tampon peu polaire (N-hydroxyethylmorpholine). Dans un tel cas, la charge de la molécule serait abaissée par ce changement des groupes ionisés de surface sans qu'il n'y ait toutefois de modifications décelables de la taille moléculaire : le K_D de la TeBG dans ce système est le même que dans les deux autres systèmes.

Le pI isoélectrique de 5,4 trouvé dans cette étude

est comparable à celui de 5,58 trouvé par O. Steeno et Coll (44). Toutefois, n'ayant pas cherché à travailler sur un gradient de pH sélectif, nous ne pouvons pas confirmer la microhétérogénéité de la TeBG trouvée par ces auteurs et qui serait liée à la présence plus ou moins importante d'acide sialique dans la molécule.

3) Méthode de purification de la TeBG

Pour purifier la TeBG, il est nécessaire de la séparer d'un composant présent en grande quantité dans le sérum et possédant approximativement la même taille et la même charge : la transferrine.

Nous avons mis au point un procédé permettant de connaître au mieux la concentration du gel pour cette séparation à pH 7.8. A ce pH, la séparation sur la base de la taille et de la charge nette sont "antagonistes", c'est-à-dire que la plus petite molécule a le moins de charge nette. Pour obtenir des conditions optimales de séparation, il faudrait travailler à un pH (si un tel pH peut être trouvé) qui fournisse une synergie de la taille et de la charge.

4) Mesure de la capacité de liaison de la TeBG

Les premiers essais de mesure de la capacité de liaison de la TeBG dans le Plasma non dilué par filtration sur gel de Sephadex ont donné des valeurs élevées dues à la liaison du ligand sur à la fois la CBG et l'albumine (1). Vermeulen et Verdonck (48) ont démontré que la capacité de

liaison de la TeBG pouvait être déterminée par filtration sur gel, mais il est nécessaire de la calculer à différentes dilutions du plasma et une correction pour la liaison de la testostérone à la CBG est nécessaire pour obtenir des résultats exacts (49). Une méthode suggérée par Pearlman (32), Gueriguian et Crepy (16) utilise aussi le Sephadex, mais nécessite de connaître la constante d'affinité de la TeBG pour le ligand. La méthode électrophorétique que nous proposons est simple, directe et évite la nécessité des corrections exigées dans les autres méthodes.

Les valeurs moyennes obtenues pour la capacité de liaison de la TeBG dans le plasma des femmes traitées aux oestrogènes et des femmes enceintes par notre méthode sont tout à fait similaires à celles obtenues par filtration sur gel (49). Cependant les valeurs normales trouvées ici sont plus basses que celles rapportées par Vermeulen (49). Il se peut que dans les faibles valeurs de la TeBG, la liaison du stéroïde à la CBG et à l'albumine soit difficile à calculer. Cette liaison non spécifique est complètement exclue dans notre méthode. De nombreuses équipes ont estimé l'affinité relative de liaison du plasma pour la testostérone par adsorption (30,33) et par dialyse à l'équilibre. En général, ces techniques, relativement aspécifiques, puisqu'elles apprécient aussi la liaison de la testostérone par la CBG et l'albumine, donnent des valeurs qui sont qualitativement semblables à celles trouvées

dans ce travail. Une comparaison stricte n'est pas possible puisque les résultats sont exprimés en unités relatives.

Il est ainsi certain qu'il existe une différence sexuelle entre la TeBG de l'homme et de la femme : les valeurs plus hautes chez la femme ont été notées en premier par Pearlman et Coll. et ont été retrouvées depuis par tous les autres auteurs (14,39) et nous même. Il est en outre intéressant de noter qu'avant la puberté les taux de la TeBG chez le garçon et la fille sont semblables et proches de ceux de la femme.

5) Avantages et limites de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans l'étude des protéines de liaison

Nous avons vu les nombreux avantages du gel de polyacrylamide dans cette thèse pour l'étude des protéines de liaison. Nous avons appliqué tout récemment avec succès cette technique pour l'étude d'une protéine cytosolique complexe, la protéine liant la progestérone dans l'oviduct de poulet (43). Nous l'avons aussi appliqué dans l'étude des caractéristiques physico-chimiques de la CBG (2).

En dépit des nombreux avantages du gel de polyacrylamide, il y a plusieurs limitations théoriques de cette technique pour l'étude des protéines de liaison des stéroïdes. Par exemple, cette méthode ne peut détecter la liaison de la testostérone à l'albumine et détecte difficilement la liaison de l'oestradiol à l'albumine. En outre, quand il existe à la fois

une protéine à haute et à faible affinité et lorsque la protéine à plus faible affinité migre en avant de l'autre (ou des autres), la dissociation du ligand de la protéine à faible K_a produit un bruit de fond élevé qui interfère avec la détection et la mesure de la protéine plus lente.

Le paramètre le plus important qui détermine dans quelle mesure un stéroïde (S) se dissociera d'une protéine de liaison (P) est k_2 , la constante de vitesse de la réaction de la dissociation du complexe stéroïde-protéine ($\overline{SP}$) :



$$\frac{d [\overline{SP}]}{dt} = - k_2 [\overline{SP}] + k_1 [S] [P] \quad (15)$$

La relation entre k_2 et la durée de l'électrophorèse est plus importante que la constante d'équilibre $K = k_1/k_2$. Donc, même si K est petit, la méthode présente sera satisfaisante pour démontrer ($\overline{SP}$) si k_2 est petit.

Cependant l'interaction du ligand avec les constituants du tampon ou avec la matrice du gel peut paraître augmenter k_2 (en fait k_2 reste constant, mais $[S]$ reste proche de 0). Des études préliminaires ont montré que cette dernière possibilité peut être obtenue : lorsque par exemple l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été faite dans le tampon N- β -hydroxyethylmorpholine, la liaison de l'oestradiol à la TeBG ne pouvait être démontrée bien que la capacité de liaison de la TeBG puisse être calculée avec la testostérone dans ce

tampon.

II- Rôle physio-pathologique de la TeBG

1) Modalités du transport de la testostérone

Le problème essentiel est de savoir par quelles protéines sont véhiculés les androgènes dans une situation physio-pathologique donnée et quelle est la quantité d'androgènes libres, actifs au niveau des organes cibles. Cette quantité d'androgènes libres ne peut être mesurée directement car elle est trop faible. Elle peut toutefois être estimée à partir des concentrations des protéines vectrices, des différents stéroïdes, et des différentes constantes d'affinité. Sachant que la testostérone plasmatique chez l'homme est d'environ $0,7\mu\text{g}/100\text{ ml}$ de plasma, et la capacité de liaison de la TeBG de $0,5\mu\text{g}$, on voit que la TeBG est saturée par la testostérone et l'excédent de testostérone se fixe sur la transcortine ($k_a = 10^6\text{l/M}$) ou l'albumine. Chez la femme par contre, où la testostéronémie est plus faible ($0,04\mu\text{g}/100\text{ ml}$) et le taux de TeBG plus élevé, la majeure partie de la testostérone doit circuler liée à la TeBG. A 37°C , Vermeulen et Verdonck (48) ont calculé que 65% de la testostérone chez l'homme serait lié à la TeBG, 30,7% à l'albumine et 1,5% à la CBG ; 2% de la testostérone serait libre. Pearlman (32) trouve des chiffres voisins : 63% de la testostérone lié à la TeBG et 37% à l'albumine. Forest et Coll par des expériences de dialyse à l'équilibre à 37°C sur

du plasma dilué ont trouvé que 6,9% de la testostérone est libre chez l'homme et 4,5% chez la femme (14).

2) Variations physio-pathologiques de la TeBG

Il est pratiquement certain que le taux plasmatique de la TeBG est directement réglé par les hormones sexuelles qui n'affectent pas, par contre, la constante d'affinité de la protéine (49). Le premier argument est la différence notée entre l'homme et la femme. Le second argument est l'inversion de cette situation par l'administration d'hormones sexuelles. L'administration d'androgènes pendant plusieurs semaines à des femmes entraîne un abaissement du taux de TeBG au niveau masculin (49) tandis que les oestrogènes données à un homme élèvent sa TeBG (29). Notons aussi dans la phase prépubertaire, sans sécrétion stéroïdienne sexuelle notable, les taux égaux de la TeBG dans les deux sexes.

Ces constatations sont à rapprocher des variations pathologiques de la TeBG. Dans l'hirsutisme féminin où existe quasi constamment une production accrue d'androgènes actifs, la TeBG est au niveau masculin (10). Par contre, chez l'homme adulte impubère ou en insuffisance androgénique, les taux sont ceux de la femme. Dans le testicule féminisant, les taux de la TeBG sont ceux de la femme normale.*

* Cf ce travail : résultats non publiés obtenus avec R. Tremblay et J.C. Migeon ; et Mauvais-Jarvis P. et Coll, J. Clin. Investig. 49, 31, 1970.

3) Conséquences physio-pathologiques de la liaison androgènes-protéines

Si la liaison des androgènes aux protéines plasmatiques a bien été étudiée in vitro et à basse température, sa signification et sa fonction *in vivo* comportent encore bien des incertitudes.

a) corrélation physiologique entre le métabolisme des androgènes et leur liaison à la TeBG.

Le métabolisme est commodément apprécié par la mesure de la clearance métabolique qui s'exprime en litres de plasma totalement et irréversiblement épuré du stéroïde en 24 heures. On imagine facilement que, plus le stéroïde est lié à une protéine spécifique, moins il sera épuré du plasma, c'est-à-dire que sa clearance métabolique sera basse.

Or il existe incontestablement chez le sujet normal une corrélation inverse entre le débit d'épuration de la testostérone et la capacité de liaison de la TeBG.

La clearance métabolique de la testostérone chez l'homme (de l'ordre de 1200 l de plasma / 24 h) est nettement plus élevée que chez la femme (environ 600 l / 24 h) .(Bardin et Coll. J. Clin. Investig., 46, 891, 1967). La 5 α -dihydrotestostérone est très liée à la TeBG et sa clearance métabolique, comme celle de la testostérone, est plus faible chez la femme que chez l'homme. Par contre, la Δ_4 - androstènedione, qui n'est pas liée à une protéine spécifique, est épurée au rythme de 2000 l/24 h, aussi bien chez l'homme que chez la

la femme.

b) Conséquences métaboliques des variations de la TeBG

Nous avons vu plus haut les variations physio-pathologiques de la TeBG. Nous voudrions maintenant les intégrer avec les données connues sur le métabolisme des androgènes.

Nous avons vu l'augmentation massive de la TeBG (8 fois) lors de la grossesse. Celle-ci s'accompagne d'une forte élévation de la testostérone plasmatique sans signes de virilisation, de même qu'il existe une augmentation de la CBG et de la cortisolémie sans signes d'hypercorticisme.

De même la baisse de la TeBG dans les virilismes va de pair avec une augmentation quasi constante de la clearance métabolique de la testostérone (et de la 5α -dihydrotestostérone), alors que le taux plasmatique de l'hormone est souvent normal. Ceci est un argument majeur pour prévoir que le taux de testostérone libre qui, répétons le, n'a pas été mesuré directement, est très vraisemblablement augmenté dans ce syndrome.

Il se peut que la TeBG joue un rôle prédominant dans le métabolisme extra-hépatique des androgènes. Rappelons que :

$$\text{clearance métabolique} = \text{clearance hépatique} + \text{clearance extra-hépatique}$$

En ce qui concerne la testostérone, c'est la clearance extra-hépatique qui est la plus intéressante car elle est direc-

tement liée à la transformation de la testostérone en métabolites actifs au niveau des organes cibles. Cette transformation (en 5α -dihydrotestostérone et en 5α -androstane-3 β -diol) serait même indispensable pour obtenir des effets androgéniques. En d'autres termes, une clearance extra-hépatique élevée reflète l'importance de l'utilisation de la testostérone par les cellules cibles (organes sexuels secondaires mâles, territoire cutané ...).

Malheureusement on ne peut pas mesurer directement à l'heure actuelle cette clearance extra-hépatique, mais on peut la calculer car il est possible de mesurer la clearance hépatique de la testostérone :

$$\begin{aligned} \text{clearance extra-hépatique} &= \text{clearance métabolique} - \text{clearance} \\ &\hspace{15em} \text{hépatique} \\ \text{clearance hépatique} &= \% \text{ d'extraction par le foie} \times \text{flux} \\ &\hspace{10em} \text{plasmatique hépatique.} \end{aligned}$$

Rivarola et Coll. (J. Clin. Investig., 46, 2095, 1967) ont montré que la clearance hépatique de la testostérone est du même ordre de grandeur, à savoir 600 l/24 h chez tous les sujets étudiés (hommes normaux, femmes normales, et femmes hirsutes) ; la seule variable entre ces sujets, d'après ces travaux, est donc la clearance extra-hépatique, qui est pratiquement nulle chez la femme normale, de l'ordre de 600 l/24 h chez l'homme normal et de 300 l/24 h chez la femme hirsute. Ces données sont fondamentales car elles laissent deviner l'ac-

tion de cet androgène au niveau des tissus récepteurs, mais on s'explique mal comment et pourquoi la TeBG empêcherait l'extraction des androgènes actifs par les organes cibles mais non par le foie. Il convient toutefois de préciser que la clearance hépatique de la testostérone a été extrapolée à partir du chiffre moyen du flux plasmatique estimé à 1500 l/24 h, sans tenir compte des dimensions corporelles. D'autre part l'extraction hépatique de la testostérone mesurée par Rivarola et Coll. était de 50% chez 2 hommes, de 38% chez 2 femmes, et cette légère différence n'a pas paru significative. On peut se demander si elle n'est pas dûe malgré tout à la TeBG.

Il apparaît donc que la TeBG joue un rôle important sur l'extraction de la testostérone essentiellement dans le secteur extra-hépatique. Mais il ne faut pas limiter à la liaison androgènes-TeBG la régulation du métabolisme des androgènes au niveau des tissus.

c) Rôle de la TeBG sur le métabolisme in vitro des androgènes.

Mowszowicz et Coll. (51) ont rapporté une expérience in vitro pour montrer le rôle de la TeBG dans le métabolisme des androgènes. La TeBG de femme enceinte a été purifiée partiellement par ces auteurs ainsi que l'albumine provenant du même sérum. La testostérone a été incubée avec des microsomes placentaires afin d'être aromatisée en oestradiol par l'aromatase placentaire. Lorsque la TeBG est ajoutée au milieu d'incu-

bation il y a une diminution considérable du taux d'aromatisation de la testostérone. Le même effet d'inhibition est observé quand l'albumine est utilisée comme la TeBG, mais ceci ne s'observe qu'à de hautes concentrations d'albumine.

De ces expériences in vivo et in vitro, on peut conclure que la TeBG ralentit le métabolisme des androgènes, notamment au niveau des organes cibles, ce qui peut avoir des conséquences physiologiques considérables. On peut attendre des études parmi les espèces de la TeBG de nombreux résultats sur le rôle de la TeBG car cette protéine est présente chez les primates, absente chez le rat et d'autres ruminants (7,25). Nous avons nous même étudié plus de 20 espèces et il est certain que l'absence de la TeBG dans de nombreuses espèces peut réaliser un modèle expérimental intéressant pour comprendre le rôle de cette protéine.

CONCLUSIONS

Nous avons étudié dans ce travail les caractéristiques physico-chimiques et la physiopathologie de la Testosterone-estradiol binding globulin (TeBG) chez l'homme.

Nous avons démontré, en utilisant essentiellement une nouvelle méthode, le gel de polyacrylamide :

1) que toutes les protéines de liaison plasmatiques des stéroïdes sont facilement identifiables et séparées par cette méthode, à condition qu'elles aient une constante d'affinité égale ou supérieure à $10^4 - 10^5$ litres / mole.

2) que la testostérone et l'oestradiol se lient à une même protéine plasmatique, la TeBG. Ceci a été prouvé d'une part par des expériences de déplacement, d'autre part par une expérience de double marquage de la TeBG.

3) le rayon, le poids moléculaire, et la valence de la TeBG ont été déterminés dans 3 tampons différents, à 3 pH. Le rayon de 2,95 $m\mu$ correspond à un poids moléculaire moyen de 98.000.

4) Le poids moléculaire de la TeBG n'est pas influencé

a) par la présence d'urée jusqu'à une concentration 4 molaire.

b) par la présence ou l'absence du ligand. La comparaison de ce poids moléculaire avec ceux obtenus par

d'autres auteurs sur des TeBG non purifiées est excellente. Par contre, la découverte récente d'un poids moléculaire de 50.000 sur la TeBG purifiée par Baulieu et Cuatrecasas pose le problème de la forme sous laquelle circule la TeBG dans le plasma : soit sous forme de dimère, soit associée à une autre protéine de poids moléculaire voisin de la TeBG ?

5) Nous avons démontré que l'on peut séparer complètement la TeBG de la transferrine en choisissant des conditions optimales de travail. Ces conditions théoriques et pratiques de séparation de deux protéines voisines en vue de la purification de l'une d'elles ont été établies dans ce travail.

6) Nous avons mesuré la capacité de liaison de la TeBG par une nouvelle méthode, spécifique et sensible. Nous avons établi expérimentalement qu'il n'y avait pas de dissociation notable du stéroïde et de la TeBG lors de l'électrophorèse, et que la TeBG restait ainsi saturée. Nous avons vérifié que la capacité de liaison ne variait pas entre pH 7.8 et 10.2 et ne dépendait pas du stéroïde utilisé.

Les valeurs obtenues montrent une différence sexuelle, les valeurs étant plus hautes chez la femme que chez l'homme. Les valeurs des enfants prépubères sont égales entre elles et égales à celles des hommes.

7) Il a été trouvé en pathologie que :

a) les femmes hirsutes ont des valeurs intermédiaires à celles de l'homme et de la femme.

b) que les testicules féminisants ont des valeurs équivalentes à celles des femmes.

c) que le pseudo-hermaphrodisme masculin, sans signe de féminisation, a des valeurs masculines.

d) que l'hyperthyroïdie expérimentale augmente de 4 à 5 fois la capacité de liaison de la TeBG.

8) Il apparaît donc que le taux de la TeBG est régi par les hormones sexuelles. La synthèse de la TeBG est sûrement, en partie au moins, sous la dépendance des oestrogènes.

9) Le taux de la TeBG est confronté dans la discussion avec les notions connues sur :

a) le métabolisme des androgènes in vivo chez les sujets normaux, dans l'hirsutisme et le testicule féminisant.

b) le métabolisme in vitro des oestrogènes par l'aromatase placentaire, modèle expérimental rapporté récemment (51).

10) En conclusion , la TeBG apparaît comme le vecteur plasmatique essentiel des androgènes et des oestrogènes chez l'homme. Il est prouvé que le taux d'épuration des androgènes dépend, en grande partie, du taux de cette protéine plasmatique dont la synthèse est dépendante des oestrogènes. Il est encore prématuré de lui assigner un rôle physiologique précis mais son importance présumée dans la différenciation sexuelle justifie la poursuite de recherches sur ce sujet.

- 1 - BERLIN G.V. , HEMPREE V.C. , and CHRAMBACH A.

Studies on a testosterone and estradiol binding globulin (TEBP) in human plasma.— Third International Congress of Endocrinology, Abstract 399, 1969.

- 2 - FERNANDEZ J.M. y COLVOI B.

Propriedades físicas del transcortin — Séminaire d'Endocrinologie., Dec 1970.

- 3 - BRATTEN R.L. and REITER T.J.

Molecular weight determinations and the influence of gel density, protein charges and protein shape in polyacrylamide gel electrophoresis—I. Chromatog. 46 , 286, 1970.

- 4 - CHADDER G.J and WESTPHALL U.

Studies on rat GPG — Biochemistry. 7 , 4272, 1968.

- 5 - CHRAMBACH A., REISEFELD S.A., WICKOW W., and ZACCARI J.

A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis — Anal. Biochem., 20, 150, 1967.

6 - GUERAMBAH A., and RODBARD D.

Polyacrylamide gel electrophoresis - Science, 177,
(sous presse).

7 - CORVOL P.

Testostérone-estradiol binding globulin (TeBG) :
physical properties, binding capacity and species
distribution - Program of the Endocrine Society,
St Louis, Mo. Abstract 73, 1970.

8 - CORVOL P., GUERAMBAH A., RODBARD D., and BARDIN C.W.

Physical properties determined by polyacrylamide
gel electrophoresis and binding capacity of testo-
stérone-estradiol binding globulin in human plasma
- J. Biol Chem, 1971 (sous presse).

9 - GREFF O., DRAY F. et SEBAOUN J.

Rôle des hormones thyroïdiennes dans les interac-
tions entre la testostérone et les protéines séri-
ques - C.R. Acad. Sciences, Paris, 264, 2651, 1967.

10 - DRAY F., SEBAOUN J., DELZANT G., CEDRU M.J., et

KOWSZOWICZ J.

Activité de liaison de la testostérone dans le sérum
des femmes présentant un virilisme pileux idiopa-
thique - Rev. Franç. et Clin Biol, 13, 622, 1968.

II - DUNKER A.K. and RUECKERT R.R.

Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gel - J. Biol. Chem., 244, 5074, 1969.

I2 - FERGUSON K.A.

Starch gel electrophoresis - Application to the classification of nutritive proteins and polypeptides - Metabolism, 13, 985, 1964.

I3 - ELIAKOW P.J., GIBBIET E.R. and MUSA B.

Increased serum thyroxine-binding globulin capacity : inheritance and linkage relationships - J. Clin. Endocr., 30, 66, 1970.

I4 - FOREST M.G., RIVAROLA M.A. and MIGEON C.J.

Percentage binding of testosterone, androstenedione, and dehydroisoandrosterone in human plasma - Steroids, 12, 323, 1968.

I5 - GUERIGUIAN J.L. and PEARLMAN W.H.

Some properties of a testosterone - binding component of human pregnancy serum - J. Biol. Chem., 243, 5226, 1968.

I6 - GUERIGUIAN J.L. et CREPEY O.

Méthode de dosage de la protéine sérique liant la testostérone - C.R. Acad. Sc, Paris, 269, 1457, 1969.

I7 - HEDRICK J.L. and SMITH A.

Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis - Arch. of Biochem. and Bioph., 126, 155, 1968.

I8 - HEYNS W., VAN BAELEN H., and DE MOOR P.

Study of the specificity of the steroid binding β -globulin in human plasma - J. Endocr., 43, 67, 1969.

I9 - KATO M. and HORTON R.

Studies of testosterone binding globulin - J. Clin. Endocr., 2, 1160, 1968.

20 - MARSHALL J.S. and PENSKY J.

Studies on human thyroxine binding globulin (TBG)-I. J. Clin. Invest., 49, 508, 1969.

21 - MERCIER C., ALFSEN A. and BAULIEU E.E.

Androgens in normal and pathological conditions - Proc. Sec. Symp. on steroids hormones, Ghent 1965, Erechtas Medical Foundation, International Congress series n° 101, p.212, 1966.

22 - MERCIER C. and BAULIEU E.E.

Récentes études des protéines plasmatiques liant la
testostérone.— Ann. Endocr., 29, 159, 1968.

23 - MERCIER-BODARD C. et BAULIEU E.E.

Affinité pour l'oestradiol de la protéine plasma-
tique de liaison de la testostérone — C.R. Acad.
Sces., Paris, 267, 804, 1968.

24 - MERCIER-BODARD C., ALFSEN A., and BAULIEU E.E.

Sex steroid binding plasma protein(SBP) —Karolinska
Symposia on research methods in reproductive
endocrinology — Acta Endocr., Suppl. 147, 204, 1970.

25 - DE MOOR P., STEENO O., HEYNS V. and VAN BATELH H.

The steroid binding β - globulin in plasma :
pathophysiological data — Ann. Endocr., 30, 233, 1969.

26 - MURPHY M.

Binding of testosterone and estradiol in plasma
— Canad. J. Biochem., 46, 299, 1968.

27 - NIKOLAI T.F. and SEAL U.S.

Chromosome linked familial decrease in thyroxine-
binding globulin activity — J. Clin. Endocr., 26,
835, 1966.

28 - OLIVO J., SOUTHREN A.L., GORDON G.G. and TOCHIMOTO S.

Studies of protein binding of testosterone in plasma in disorders of the thyroid function : effect of therapy -- J. Clin. Endocr., 31, 539, 1970.

29 - PEARLMAN W.H., CREPY O. and MURPHY M.

Testosterone-binding levels in the serum of women during the normal menstrual cycle, pregnancy, and the post-partum period -- J. Clin. Endocr., 27, 1012, 1967.

30 - PEARLMAN W.H. and CREPY O.

Steroid-protein Interaction with particular reference to testosterone binding by human serum --J. Biol. Chem., 242, 182, 1967.

31 - PEARLMAN W.H., FONG I.F.F., and TOU J.H.

A further study of a testosterone-binding component of human pregnancy serum -- J. Biol. Chem., 244, 1373, 1969.

32 - PEARLMAN W.H.

Measurement of testosterone binding sites. Karolinska Symposia on research methods in reproductive endocrinology -- Acta. Endocr. (suppl.) , 147, 225, 1970.

- 33 - POHIMAN C., HALLBERG M.C., ZORN E.H., GUEVARA A. and
WIELAND R.G.

Testosterone binding affinity (TBA) : alteration
produced by pathological and physiological states
-- Am. J. Med. Sci., 258, 270, 1969.

- 34 - RAZ A., SHIRATORI T. and GOODMAN D.

Studies on the protein-protein and protein-ligand
interactions involved in retinal transport in
plasma -- J. Biol. Chem., 245, 1903, 1970.

- 35 - ROBERTS R.C., and NIKOLAI T.F.

Assay of thyroxine-binding globulin by polyacrylamide
electrophoresis : normal values -- Clinical Chemistry.,
15, 367, 1969.

- 36 - RODBARD D. and CHRAMBACH A.

Estimation of molecular radius, free mobility, and
valence using polyacrylamide gel electrophoresis --
Anal. Biochem., (sous presse 1971).

- 37 - RODBARD D. and CHRAMBACH A.

Unified theory for gel electrophoresis and gel fil-
tration -- Proc. Nat. Acad. Sci., 65, 970, 1970.

38 - ROSENBAUM W., CHRISTY N.P. and KELLY W.G.

Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen-binding β -globulin in human plasma - J. Clin. Endocr., 26, 1399, 1966.

39 - ROSNER W. and DEAKINS S.M.

Testosterone-binding globulins in human plasma : studies on sex distribution and steroid specificity - J. Clin. Invest., 47, 2109, 1968.

40 - ROSNER W., CHRISTY N.P., KELLY W.G.

Partial purification and preliminary characterization of estrogen - binding globulins from human plasma - Biochemistry, 8, 3100, 1969.

41 - RUDER H., CORVOL P., MAFOUDEAU J., ROSS G.A. and LIPSETT M.B.

The effects of hyperthyroidism on the rate of estradiol metabolism in man - J. Clin. Endocr., (sous presse 1971.)

42 - SANDBERG A.A., SLAUNWHITE W.R.Jr.

Transcortin : a corticosteroid - binding protein of plasma : II levels in various conditions and the effects of estrogens - J. Clin. Invest., 38, 1290, 1957.

43 - SHERMAN M.R., CORVOL P., and O'MALLEY B.W.

Progesterone - binding components of chick oviduct

I- Preliminary characterization of cytoplasmic components - J. Biol. Chem., 245, 6085, 1970.

44 - STEENO O., HEYNS W., VAN BAELEN H. and DE MOOR P.

Testosterone binding in human plasma - Ann. Endocr. ,
29, 141, 1968.

45 - TAVERNETTI R.R., ROSENBAUM W., KELLY G., CHRISTY N.P.,
and ROGINSKY M.S.

Evidence for the presence in human plasma of an
estrogen - binding factor other than albumin : abnormal
binding of estradiol in men with hepatic cirrhosis
- J. Clin. Endocr., 27, 920, 1967.

46 - VAN BAELEN H., HEYNS W., SCHONNE E. and DE MOOR P.

An estradiol binding globulin in human serum : partial
purification - Ann. Endocr., 29, 153, 1968.

47 - VAN BAELEN H., HEYNS W., and DE MOOR P.

Microheterogeneity of the testosterone binding glo-
bulin of human pregnancy demonstrated by isoelectric
focusing - Ann. Endocr., 30, 199, 1969.

48 - VERHEIJEN A., and VAN DER STRAETEN M.

Studies on the binding of testosterone to human plasma -- Steroids, II, 609, 1968.

49 - VERHEIJEN A., VANSTONCK L., VAN DER STRAETEN M., and ORIE N.

Capacity of the testosterone - binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate -- J. Clin. Endocrin., 32, 117, 1970.

50 - WINTER K. and AGOSTINI W.

The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis -- J. Biol. Chem., 244, 4406, 1969.

51 - MOVSCHOWITZ J., KAHN D. and DEAY F.

Influence of testosterone binding to serum proteins on aromatization by enzymes of human placental microsomes -- J. Clin. Endocrin., 31, 624, 1970.

LEGENDE DES FIGURES

- 1 - Mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la TeBG, de la CBG et de l'albumine dans un sérum de femme traitée aux oestrogènes.
- 2 - Déplacement de la testostérone- ^3H liée à la CBG et à la TeBG (a) par :
 - un excès de cortisol (b)
 - un excès d'oestradiol (c)
- 3 - Expérience de double marquage de la TeBG par l'oestradiol- ^3H et la testostérone- ^{14}C .
- 4 - Courbe de Ferguson, pH 8.8.
- 5 - Courbe standard, pH 8.8.
- 6 - Effet de l'urée sur la dissociation de la testostérone- ^3H de la TeBG.
- 7 - Séparation de la transferrine- ^{59}Fe et de la TeBG marquée par la testostérone- ^3H .
- 8 - Isoélectrofocusing de la TeBG.
- 9 - Courbe de titration de la TeBG.
- 10 - Courbe de saturation de la TeBG et de la CBG dans un sérum de femme traitée aux oestrogènes par la testostérone- ^3H .
- 11 - Détermination de la capacité de liaison de la TeBG dans un

sérum masculin. Liaison de la 5 α -dihydrotestostérone-³H à l'albumine humaine.

- 12 - Effet du ligand (a), du stéroïde endogène (b) et du pH (c) sur la capacité de liaison de la TeBG.
- 13 - Courbe de dilution de la TeBG.
- 14 - Valeurs normales de la TeBG.

ANNEE 1971

Nº

THESE POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplome d'Etat

Par

Pierre CORVOL

né le 18 Aout 1941 à Boulogne (Seine)

Interne des Hopitaux de Paris

Diplomé d'Etudes Approfondies de Biochimie

Présentée et soutenue publiquement le

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET PHYSIO-PATHOLOGIQUE DE LA

TESTOSTERONE-OESTRADIOL BINDING GLOBULINE

CHEZ L'HOMME

Président : P. MILLIEZ, Professeur.

LE DOYEN DE LA FACULTE DE MEDECINE
BROUSSAIS - HOTEL DIEU

P. MILLIEZ



Faculté de Médecine
BROUSSAIS - HOTEL-DIEU

VU

et PERMIS D'IMPRIMER
LE RECTEUR
DE L'ACADEMIE DE PARIS

Mallin

